

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Sofia Alexandra Muchacho Santos

Tolerância à vancomicina em *Enterococcus faecalis*: papel de proteínas hipotéticas

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Doutora Maria de Fátima Lopes (IBET-ITQB/UNL)

Co-orientador:

Doutor Paulo Marujo (IBET-ITQB/UNL)

Elo de Ligação:

Prof.^a Doutora Ana Madalena Ludovice (FCT/UNL)

LISBOA

2009

nº de arquivo
“Copyright”

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Sofia Alexandra Muchacho Santos

Tolerância à vancomicina em *Enterococcus faecalis*: papel de proteínas hipotéticas

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Doutora Maria de Fátima Lopes (IBET-ITQB/UNL)

Co-orientador:

Doutor Paulo Marujo (IBET-ITQB/UNL)

Elo de Ligação:

Prof.^a Doutora Ana Madalena Ludovice (FCT/UNL)

LISBOA

2009

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Fátima Lopes, pela amizade, rigor científico, por toda a disponibilidade e constante motivação. O meu Muito Obrigado!

Agradeço ao meu co-orientador, Doutor Paulo Marujo, pela disponibilidade incondicional, pelo sentido crítico e rigor e pelo conhecimento que partilhou ao longo deste ano e que muito ajudaram na concretização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, à Neuza, à Teresa, ao Doudou, à Renata, à Tânia e à Marta bom ambiente de trabalho, pela ajuda preciosa e pelos bons momentos de convívio.

À minha família, especialmente aos meus pais e irmão, que sempre me ajudaram e incentivaram com uma extrema confiança em mim. Sem eles não teria sido possível!

A todos os meus amigos o meu muito obrigado pela confiança, luta conjunta, e alegrias proporcionadas.

Resumo

Enterococcus faecalis é um agente patogénico oportunista e um dos principais responsáveis por infecções nosocomiais. A sua virulência é multifactorial e ainda pouco compreendida. 36 % do genoma de *E. faecalis* V583 está anotado como genes que codificam proteínas hipotéticas ou de função desconhecida (PHFD). Estudos de transcriptómica têm sugerido a implicação destes genes na resposta a vários *stresses* em *E. faecalis*. No entanto, não têm existido muitas tentativas para atribuir uma função a estes genes. Num estudo efectuado anteriormente com V583 submetido a uma dose terapêutica de vancomicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) observou-se que 50 % dos genes cuja transcrição foi afectada codificam para PHFD. No presente estudo, seleccionaram-se alguns destes genes (EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896) que apresentaram um aumento mais marcante nos níveis de expressão. Os resultados dos *microarrays* para os genes referidos foram confirmados por RT-PCR semi-quantitativo, mais uma vez sugerindo um papel para estes genes na resposta de *E. faecalis* à vancomicina.

Procedeu-se à expressão das proteínas hipotéticas codificadas por aqueles genes em *E. coli* e à construção de mutantes. Estes mutantes encontram-se em fases diferentes de construção e até ao momento foi possível obter o mutante do EF2292. Este não revelou alterações no fenótipo de resistência à vancomicina, comportando-se de forma idêntica à estirpe selvagem. Quanto à expressão das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292, está em curso a optimização das condições para purificação e obtenção da sua estrutura.

Este trabalho constitui um passo no sentido de tornar conhecido o que é ainda desconhecido no genoma e comportamento de *E. faecalis*.

Abstract

The opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* is one of the most reported causes of nosocomial infections. Its virulence is an outcome of multiple factors and is yet poorly understood. 36 % of the genome of *E. faecalis* strain V583 is annotated as hypothetical proteins or of unknown function (HPUF). Transcriptomic studies have suggested a role of these genes in response of *E. faecalis* to several stresses. In a previous transcriptomic study with V583 subjected to a therapeutic dose of vancomycin ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 50 % of the differentially transcribed genes were HPUF. In this study, we selected some of the genes which were most up-regulated (EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896) and we confirmed by semi-quantitative RT-PCR the microarray results. This suggests a role for those genes in the response of V583 to vancomycin. The work also involved the expression of the HPUF in *E. coli* and mutant construction. The mutants are in different stages of completion and EF2292 was successfully deleted. However, ΔEF2292 did not show any differences from the wild-type V583 ΔABC concerning resistance and growth in the presence of vancomycin. HPUF EF1231 and EF2292 were successfully over-produced in *E. coli* and optimization of purification procedures and structure solving are on-going. The present work is a step forward into the increased knowledge of *E. faecalis* genome and behavior.

Abreviaturas

BHI – *Brain Heart Infusion*

C41 – *Escherichia coli* C41

C43 – *Escherichia coli* C43

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DIG - Digoxigenina

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

dNTP – *Deoxyribonucleotide Triphosphate*

DO – Densidade óptica

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

E. coli – *Escherichia coli*

IPTG – *Isopropyl b-D-1-Thiogalactopyranoside*

Kb – kilo pares de bases

LA – *Luria-Bertani agar*

LB – *Luria-Bertani broth*

M17Glu – M17 suplementado com 0,5 % de glucose

M17GluA – M17 agar suplementado com 0,5% de glucose

MH – *Mueller Hinton*

MHA – *Mueller Hinton agar*

mRNA – *messenger Ribonucleic Acid*

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RBS – *Ribosome Binding Site*

RNA – *Ribonucleic Acid*

Rosetta 2 – *Escherichia coli Rosetta 2*

RT-PCR – *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*

SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

T_m – *Melting Temperature*

tRNA – *transfer Ribonucleic Acid*

V583 ΔABC – *Enterococcus faecalis* V583 ΔABC

VRE – *Vancomycin Resistant Enterococci*

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Abreviaturas.....	iv
Índice	v
1. Introdução.....	1
1.1 Perspectiva Histórica	1
1.2 Género <i>Enterococcus</i>	1
1.3 Patogénese em <i>Enterococcus</i>	3
1.4 Resistência a antibióticos	4
1.5 Glicopéptidos	6
1.5.1 Mecanismo de acção dos Glicopéptidos	7
1.6 Resistência à vancomicina em <i>Enterococcus</i>	8
1.6.1 Mecanismos de Resistência: fenótipos e genes envolvidos na resistência	8
2. Materiais e Métodos	13
2.1 Microrganismos e condições de crescimento	13
2.2 Análise de RNA	13
2.2.1 Extracção de RNA.....	13
2.2.2 Análise da expressão dos genes por RT-PCR semiquantitativo	14
2.3 Análise de DNA.....	15
2.3.1 Extracção de DNA Cromossómico	15
2.3.2 Amplificação de DNA por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	15
2.3.3 Separação de fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose	18
2.3.4 Purificação dos produtos de PCR	19
2.3.5 Preparação de misturas de Ligação	19
2.3.6 Extracção de DNA plasmídico	20
2.4 Preparação de células competentes e transformação	20

2.4.1	Preparação de células electrocompetentes e transformação por electroporação	20
2.4.2	Preparação de células competentes e choque térmico	20
2.5	Construção de mutantes de <i>E. faecalis</i> V583 Δ ABC	21
2.5.1	Construção de mutantes por deleção	21
2.5.1.1	Obtenção dos fragmentos I, II e III	21
2.5.1.2	Clonagem dos produtos de PCR nos vectores pGEM®-T e pG+host9	22
2.5.1.3	Seleção dos transformantes <i>single crossing-over</i> (SCO) e <i>double crossing-over</i> (DCO)	23
2.5.2	Construção de mutantes por inserção de uma cassette de resistência à tetraciclina	24
2.5.2.1	Clonagem dos produtos de PCR no vector pVE14218	25
2.5.2.2	Seleção dos integrantes por choque térmico	25
2.6	Análise por <i>Southern blotting</i>	25
2.6.1	Restrição enzimática de DNA cromossómico	25
2.6.2	Transferência	27
2.6.3	Hibridação	28
2.6.4	Deteção	28
2.7	Estudo do mutante <i>E. faecalis</i> V583 Δ ABC Δ EF2292	28
2.7.1	Teste de susceptibilidade a diferentes antibióticos	28
2.7.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a vancomicina	29
2.7.3	Curvas de crescimento	29
2.8	Expressão das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292	30
2.8.1	Análise das Sequências	30
2.8.2	Clonagem de DNA no vector pET-15b	30
2.8.3	Ensaio de Expressão	31
2.8.4	Análise por SDS-PAGE	31
2.8.4.1	Preparação das amostras	31
2.8.4.2	SDS-PAGE	31
3.	Resultados	33
3.1	Análise da expressão por RT-PCR semi-quantitativo	33

3.2	Construção de mutantes	34
3.2.1	Mutantes por deleção	34
3.2.1.1	Amplificação dos fragmentos I, II e III	34
3.2.1.2	Clonagem dos produtos de PCR nos vectores pGEM®-T e pG+host9	36
3.2.1.3	Seleção dos clones integrantes (SCO)	38
3.2.1.4	Seleção dos clones com deleção (DCO)	39
3.2.2	Construção de mutantes por inserção de uma cassette de resistência	41
3.2.2.1	Amplificação dos fragmentos internos EF0802 e EF2896	41
3.2.2.2	Clonagem dos produtos de PCR no vector pVE14218	41
3.2.2.3	Seleção dos integrantes em <i>E. faecalis</i> V583 Δ ABC por choque térmico	42
3.2.3	Confirmação dos mutantes por <i>Southern blotting</i>	43
3.2.3.1	Confirmação da deleção no gene EF2292	43
3.2.3.2	Confirmação da inserção da cassette de resistência à tetraciclina nos genes EF0802 e EF2896	44
3.3	Teste de susceptibilidade a antibióticos	45
3.4	Curvas de Crescimento	46
3.5	Expressão heteróloga das proteínas EF1231 e EF2292	47
3.5.1	Análise de sequências	47
3.5.2	Amplificação e Clonagem dos produtos de PCR no vector pET-15b	49
3.5.3	SDS-PAGE	51
4.	Discussão	52
5.	Bibliografia	55
6.	Anexos	60

1. Introdução

1.1 Perspectiva Histórica

O termo *entérocoque* foi utilizado pela primeira vez em 1899, por Thiercelin, para descrever uma nova espécie de diplococos Gram-positiva de origem intestinal (Thiercelin, 1899). Anos mais tarde, em 1906, este microrganismo foi designado de *Streptococcus faecalis*, tendo sido introduzido no género *Streptococcus* (Andrewes e Horder, 1906). Posteriormente em 1919, foi isolado por Orla-Jensen um segundo microrganismo de origem fecal e com características semelhantes a *S. faecalis*, denominado *Streptococcus faecium* (Orla-Jensen, 1919). Em 1933, Lancefield introduziu o sistema de identificação e classificação serológica de *Streptococcus*, baseada na composição dos antígenos bacterianos presentes. Os *Enterococcus* foram classificados como pertencentes ao grupo D (Lancefield, 1933). Sherman, em 1937, criou um sistema para a classificação que dividiu os *Streptococcus* em quatro grupos, lácticos, *viridans*, piogénicos e enterococos (Sherman, 1937). Uma nova proposta, em 1970, sugeriu a transferência dos *S. faecalis* e *S. faecium* para o género *Enterococcus* (Kalina, 1970). Contudo, isto só vem a acontecer em 1984, como consequência do aparecimento de técnicas de hibridação de DNA-DNA, DNA-rRNA, e após estudos que confirmaram uma maior distância entre *Streptococcus* e *Enterococcus*. Como tal, foram classificados taxonomicamente em *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Lactobacillales*; *Enterococcaceae*; *Enterococcus* (Schleifer e Kilpper-Balz, 1984). Desde então, o número de espécies pertencentes a este género tem vindo a aumentar, conhecendo-se actualmente 37 espécies (<http://www.dsmz.de/microorganisms/>, acedido a 19/09/2009).

1.2 Género *Enterococcus*

Os *Enterococcus* são bactérias Gram-positivas em forma de cocos que podem surgir isolados, aos pares ou em cadeia. Não formam esporos e o seu genoma tem um baixo conteúdo em G+C (entre 37 e 45 mol %) (Murray, 1990, Facklam *et al.*, 2002, Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Sood *et al.*, 2008, Fisher e Phillips, 2009).

São bactérias anaeróbias facultativas, catalase negativa, oxidase negativa, hidrolisam a esculina na presença de 40 % de sais biliares e realizam fermentação láctica. A temperatura óptima de crescimento situa-se nos 35 °C a 37 °C, no entanto podem crescer a temperaturas

entre 10 e 45 °C (Murray, 1990, Facklam *et al.*, 2002, Giraffa, 2003, Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Ogier e Serror, 2008, Fisher e Phillips, 2009).

A maioria das espécies do género *Enterococcus* é capaz de sobreviver a variada gama de *stresses* e condições ambientais adversas, tais como, elevadas concentrações salinas, como 6,5 % (w/v) de cloreto de sódio, valores de pH extremos (4 a 9,6) e elevadas temperaturas, pois são capazes de sobreviver a 60 °C durante 30 minutos (Ogier e Serror, 2008, Sood *et al.*, 2008, Fisher e Phillips, 2009).

A identificação de espécies de *Enterococcus* através de testes fisiológicos tem alguns problemas associados devido à elevada heterogeneidade fenotípica (Giraffa, 2003, Ogier e Serror, 2008). Por outro lado, a identificação de espécies por testes convencionais requer longos tempos de incubação (Ogier e Serror, 2008). Os métodos de identificação genotípica que utilizam os genes dos RNAs ribossomais 16S e 23S são mais exactos, permitindo também a identificação do género. Contudo, nem sempre permitem a identificação da espécie de *Enterococcus*, como por exemplo, de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, pois os seus genes do RNA ribossomal 16S apresentam uma homologia de 99,8 %. Deste modo, existem métodos alternativos que têm sido aplicados com sucesso, como por exemplo, a amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de vários genes específicos, tais como do gene *dll* (codifica para a proteína D-alanina-D-alanina ligase), dos genes do operão *van* (envolvidos na resistência à vancomicina), do gene *ace* (codifica para uma adesina bacteriana) e do gene *sodA* (codifica a proteína superóxido dismutase dependente do manganês). A amplificação por PCR do gene EF0027 (codifica para um regulador transcricional putativo) e sequenciação do gene *dll* e do gene *atpA* (codifica a subunidade alfa da ATP sintase), poderão também ser utilizados na identificação de espécies de *Enterococcus* (Ogier e Serror, 2008). Estão também disponíveis comercialmente métodos de identificação, como por exemplo, o sistema *Vitek*, API 20S, API Rapid ID 32 e *Crystal gram-positive kits* (Facklam *et al.*, 2002, Ogier e Serror, 2008).

Os enterococos fazem parte da flora comensal do tracto gastrointestinal de humanos, mas também de animais, podendo também colonizar a cavidade oral, o sistema génito-urinário e a pele (Giraffa, 2003, Sood *et al.*, 2008), sendo as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as mais frequentes em humanos (Fisher e Phillips, 2009).

Devido à sua capacidade de resistir e crescer em ambientes hostis, podem também ser encontrados em águas superficiais, solo, plantas e alimentos (por exemplo, produtos lácteos e carne), como resultado da contaminação fecal (Giraffa, 2003).

Os *Enterococcus* podem ainda ter um papel importante na produção de queijos, provavelmente, como resultado da sua capacidade proteolítica, lipolítica e de metabolizar o citrato (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Podem ainda contribuir para o reforço das mucosas do intestino, actividade anti-mutagénica e anti-carcinogénica, estimulação do sistema imunitário e diminuição dos níveis de colesterol. Tais factos levaram a que pudessem ser usados na indústria alimentar como probióticos, porém, o seu uso continua um assunto controverso. Apesar do papel benéfico, a emergência de estirpes de *Enterococcus* com resistências antimicrobianas, a sua crescente associação a uma variedade de infecções nosocomiais e o seu envolvimento na deterioração de alimentos, têm levantado preocupações quanto ao uso dos enterococos como probióticos. Estas preocupações devem-se ao risco de transferência de genes de resistências antimicrobianas e de genes que codificam factores de virulência para as estirpes da flora comensal do tracto gastrointestinal humano (Franz *et al.*, 2003, Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Ogier e Serror, 2008). Deste modo, apesar de serem bactérias lácticas não são considerados como microrganismos *Generally Recognized As Safe* (GRAS) e a sua detecção em água é um indicador de contaminação fecal (Hugas *et al.*, 2003, Ogier e Serror, 2008).

1.3 Patogénese em *Enterococcus*

Os *Enterococcus* estão entre os principais agentes patogénicos responsáveis por infecções nosocomiais graves em doentes imunocomprometidos ou sob terapêutica com antimicrobianos, como endocardite, bacteremia, infecções do tracto urinário, sistema nervoso central, infecções intra-abdominais e pélvicas (Franz *et al.*, 1999, Franz *et al.*, 2003, Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Poh *et al.*, 2006).

A patogenicidade observada neste género de bactérias pode resultar do aumento crescente de *Enterococcus* resistentes a múltiplos antibióticos, em particular à vancomicina, e dos vários factores de virulência sintetizados (Jett *et al.*, 1994, Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Entre estes destacam-se a substância de agregação (Agg), envolvida na formação de agregados na conjugação bacteriana; a proteína de superfície extracelular (Esp), que promove a adesão, colonização e evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, e pode ainda desempenhar um papel na resistência a antibióticos e contribuir para a formação de biofilmes; a citolisina (Cyl), uma toxina que tem propriedades β -haemolíticas em humanos e actividade

bactericida contra outras bactérias Gram-positivas; enzimas hidrolíticas, como hialuronidasas, que actuam no ácido hialurónico causando danos nos tecidos; a gelatinase (GelE), uma protease que hidrolisa gelatina, caseína, hemoglobina e outros péptidos bioactivos; e a protease serínica (SprE), também envolvida na degradação do tecido do hospedeiro (Jett *et al.*, 1994, Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Ogier e Serror, 2008, Fisher e Phillips, 2009, Giridhara Upadhyaya *et al.*, 2009). Devido a estas características patogénicas, estas bactérias estão entre as principais causas de infecções nosocomiais em todo o mundo (Ogier e Serror, 2008) e a taxa de mortalidade situa-se perto dos 20 a 30 % (Lavigne *et al.*, 2005, Ogier e Serror, 2008). Os *Enterococcus* são a segunda causa mais frequente de infecções resultantes de feridas cirúrgicas e infecções nosocomiais do tracto urinário e a terceira causa mais frequente de bacteremia (Lopes *et al.*, 2005). Apesar de muitas espécies de *Enterococcus* serem responsáveis por este tipo de infecções, a espécie *E. faecalis* é a predominante, sendo responsável por 80 a 90 % das infecções, seguindo-se *E. faecium*, associados à maioria das restantes infecções (Franz *et al.*, 2003). As infecções causadas por estirpes de *E. faecium* têm vindo a aumentar, o que pode estar associado à emergência de estirpes resistentes a antibióticos (Mundy *et al.*, 2000).

As espécies *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus* e *Enterococcus mundii*, ocasionalmente também provocam infecções em humanos (Ribeiro *et al.*, 2008, Top *et al.*, 2008).

1.4 Resistência a antibióticos

O aumento de infecções nosocomiais causadas por enterococos tem sido bastante investigado, devido ao aumento do número de resistências a uma variedade de antibióticos. Este aumento da incidência de *Enterococcus* resistentes a antibióticos, não se confina inteiramente ao meio hospitalar. Resulta também do uso dos antibióticos na agricultura, como promotores de crescimento e tratamento de animais, assim como na comunidade (Lopes *et al.*, 2005).

Inicialmente, o problema do aparecimento de estirpes resistentes a determinados antibióticos, foi resolvido pelo desenvolvimento de novas classes de antibióticos, tais como os

aminoglicosídeos, os macrólidos e glicopéptidos. Todavia, rapidamente surgiram as primeiras estirpes resistentes a estas classes de antibióticos (Gold e Moellering, 1996).

Existem vários mecanismos bioquímicos que permitem às bactérias escapar à acção letal dos antibióticos, de entre os quais se pode destacar a baixa acumulação intracelular do antibiótico pela alteração da permeabilidade da membrana externa, diminuição do transporte através da membrana interna ou mecanismos de efluxo; alteração do alvo por mutação ou modificação enzimática e inactivação enzimática do antibiótico. A coexistência de vários mecanismos de resistência a antibióticos, no mesmo microrganismo, pode originar *Multi-Drug Resistance* (MDR) (Depardieu *et al.*, 2007).

A resistência a antibióticos em *Enterococcus* pode ser dividida em duas classes, resistência intrínseca e resistência adquirida (Tabela 1.1). As resistências intrínsecas devem-se à ausência de locais alvo para um determinado antibiótico ou à incapacidade para atravessar a parede celular e atingir o seu alvo intracelular (Murray, 1990, Mundy *et al.*, 2000, Marothi *et al.*, 2005, Sood *et al.*, 2008, Top *et al.*, 2008). As resistências adquiridas, desempenham um papel mais importante na emergência das resistências a antimicrobianos e podem surgir de mutações cromossómicas ou troca genética de elementos móveis de DNA, como transposões ou plasmídeos (Marothi *et al.*, 2005, Top *et al.*, 2008).

Tabela 1.1 – Resistências antimicrobianas intrínsecas e adquiridas em *Enterococcus* (Top *et al.*, 2008).

Resistência Intrínseca	Resistência adquirida
β-lactâmicos	Ampicilina (elevado nível)
Penicilinas (baixo nível)	Aminoglicosídeos (elevado nível)
Carbapenemes (nível intermédio)	Macrólidos
Cefalosporinas (elevado nível)	Cloranfenicol
Aminoglicosídeos (nível baixo)	Tetraciclina
Aminoglicosídeos (nível intermédio)	Quinolonas
Licosamidas e Estreptograminas A	Glicopéptidos (elevado nível)
Glicopéptidos (baixo nível)	Oxazolidinonas

A resistência intrínseca a muitos dos agentes antimicrobianos mais comuns, pode constituir uma vantagem cumulativa para futura aquisição de genes que codifiquem um elevado nível de resistência. Adicionalmente, é importante referir que estas transferências

genéticas frequentemente ocorrem no tracto gastrointestinal de humanos e animais que contêm, muitas vezes, bactérias sob pressões selectivas devido à exposição contínua a níveis terapêuticos ou sub-terapêuticos de antimicrobianos (Mundy *et al.*, 2000). Como tal, o desenvolvimento de resistências a antimicrobianos durante a terapia, ameaça o sucesso do tratamento de várias infecções e pode conduzir à dispersão dos microrganismos resistentes a outros pacientes e na comunidade. De facto, o aumento de resistências a antibióticos parece estar relacionado com o seu crescente uso (Lopes *et al.*, 2005). Assim, a capacidade das bactérias para acumularem e trocarem informação genética, e a elevada pressão selectiva resultante do uso indiscriminado de antibióticos, têm determinado a existência e a rápida disseminação de diferentes mecanismos de resistência (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000, Depardieu *et al.*, 2007).

1.5 Glicopéptidos

A vancomicina e a teicoplanina pertencem ao grupo dos antimicrobianos glicopéptidos. Os glicopéptidos caracterizam-se por serem moléculas grandes, rígidas e hidrofóbicas com uma estrutura de sete péptidos aos quais estão ligados cinco a sete anéis aromáticos e diferentes glícidos (Barna e Williams, 1984).

A vancomicina foi isolada pela primeira vez, na década de 50, a partir da bactéria *Amycolatopsis orientalis* e passou a estar disponível para uso clínico em 1958 (Nicolaou *et al.*, 1999), contudo o seu uso foi limitado devido à sua toxicidade (Pootoolal *et al.*, 2002). O aumento da prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), na década de 70, conduziu ao aumento do uso de vancomicina. O surgimento de uma forma purificada de vancomicina e menos tóxica levou a um aumento acentuado na sua utilização (Gold, 2001).

Os antibióticos glicopéptidos inibem a síntese do peptidoglicano sendo usados no tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas (Arthur *et al.*, 1996) e têm também sido utilizados como último recurso, para combater infecções em casos de resistências múltiplas observadas em *Enterococcus* (Cetinkaya *et al.*, 2000).

Os primeiros isolados clínicos resistentes à vancomicina foram detectados na Europa em 1986 e desde então, os *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) dispersaram-se rapidamente pelo mundo (Top *et al.*, 2008). O consumo destes antibióticos em grandes

quantidades e a sua utilização em concentrações sub-terapêuticas na produção de animais pode ter desempenhado um papel muito importante no aparecimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000, Gold, 2001).

1.5.1 Mecanismo de acção dos Glicopéptidos

Na síntese do peptidoglicano em *Enterococcus*, há a ligação de duas moléculas de D-Alanina por uma enzima, D-Ala:D-Ala ligase (Ddl), dando origem a um dipéptido, D-Ala-D-Ala, que depois é ligado a UDP-N-acetilmuramil-tripéptido formando o UDP-N-acetilmuramil-pentapéptido (Figura 1.1A). Este pentapéptido quando incorporado na cadeia nascente do peptidoglicano (transglicosilação), permite a formação de ligações cruzadas (transpeptidação) que contribuem para a rigidez do peptidoglicano (Cetinkaya *et al.*, 2000).

O alvo molecular dos glicopéptidos é o C-terminal dos resíduos dos precursores do peptidoglicano, D-Ala-D-Ala. Pela ligação a este dipéptido, os glicopéptidos interferem com a formação normal da parede, ao inibirem as reacções de transglicosilação e transpeptidação da cadeia nascente de peptidoglicano, resultando na morte celular (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000, Depardieu *et al.*, 2007, Top *et al.*, 2008). Na Figura 1.1, encontra-se uma representação das vias para a síntese dos precursores do peptidoglicano em *Enterococcus* com fenótipo VanA.

Em geral, as bactérias Gram-negativas são intrinsecamente resistentes aos glicopéptidos, devido à impermeabilidade da membrana externa (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000).

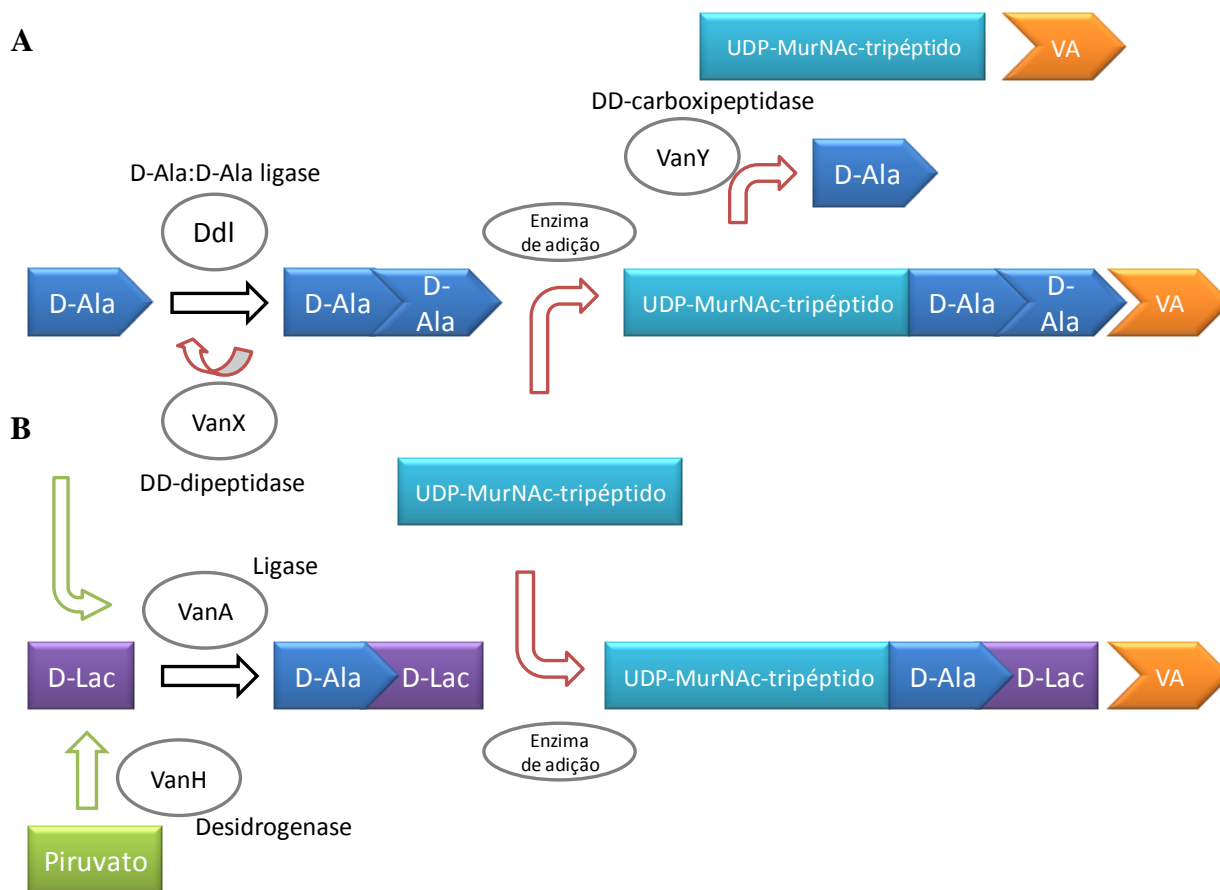


Figura 1.1 – Representação esquemática das duas vias para a síntese de precursores do peptidoglicano em *Enterococcus VanA*. (A) Esta via produz o precursor do peptidoglicano nativo que é o alvo para a vancomicina. (B) O precursor do peptidoglicano alterado tem baixa afinidade para a vancomicina. VA – Vancomicina; UDP – MurNAc-tripeptido - UDP-N-acetilmuramil-tripéptido (Adaptado de Gold, 2001).

1.6 Resistência à vancomicina em *Enterococcus*

1.6.1 Mecanismos de Resistência: fenótipos e genes envolvidos na resistência

Em *Enterococcus* susceptíveis à vancomicina, esta liga-se ao resíduo terminal D-Ala-D-Ala do pentapéptido precursor, bloqueando a síntese da parede celular. No entanto, os enterococos desenvolveram um mecanismo sofisticado para superar estes antibióticos (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000). O mecanismo de resistência resulta da modificação do alvo molecular de ligação do antibiótico. A resistência aos glicopéptidos é originada pela substituição de precursores do peptidoglicano D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lactato (D-Ala-D-

Lac) (*vanA*, *vanB* e *vanD*) ou D-Ala-D-Serina (D-Ala-D-Ser) (*vanC*, *vanE*, *vanG* e *vanL*), para os quais os glicopéptidos exibem baixa afinidade de ligação (Gold, 2001, Depardieu *et al.*, 2007, Boyd *et al.*, 2008).

Actualmente, em enterococos existem sete fenótipos de resistência à vancomicina descritos: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG e VanL (Tabela 1.2) (Boyd *et al.*, 2008, Top *et al.*, 2008).

Tabela 1.2 – Fenótipos de Resistência à Vancomicina (Adaptado de Top *et al.* 2008).

	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG	VanL
Tipo de Resistência	Adquirida	Adquirida	Intrínseca	Adquirida	Adquirida	Adquirida	Adquirida
CIM							
Vancomicina (mg.L ⁻¹)	64 - 1000	4 - 1000	2 - 32	64 - 128	16	8 - 16	8
CIM							
Teicoplanina (mg.L ⁻¹)	16 - 512	0,5 - 1	0,5 - 1	4 - 64	0,5	0,5	0,5
Expressão	Induzida	Induzida	Induzida/ Constitutiva	Constitutiva	Induzida	Induzida	Induzida
Alvo Modificado	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Localização	Plasmídeo/ Cromossoma	Plasmídeo/ Cromossoma	Cromossoma	Cromossoma	Cromossoma	Cromossoma	Cromossoma

Apesar de existirem vários tipos de resistência em que os genes codificam para proteínas com funções enzimáticas relacionadas, estes podem ser distinguidos pelos vários modos de regulação da expressão génica e pela sua localização (Figura 1.2) (Depardieu *et al.*, 2007). Os tipos VanA e VanB estão localizados em plasmídeos ou no cromossoma e foram descritos pela primeira vez em *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo os mais relevantes clinicamente. Resultam da aquisição de elementos genéticos móveis, o transposão Tn1546

(VanA) e os transposões Tn1547 ou Tn1549 (VanB) (Cetinkaya *et al.*, 2000, Chavers *et al.*, 2003, Tendolkar *et al.*, 2003, Top *et al.*, 2008).

O fenótipo do tipo VanA é caracterizado pela resistência adquirida a elevados níveis de vancomicina e teicoplanina e a resistência é induzida por ambos os antibióticos (Tabela 1.2) (Gold, 2001). O tipo VanA tem sido descrito em *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium* e *E. gallinarum* (Arthur e Courvalin, 1993, Woodford, 1998). O operão de resistência *vanA* é constituído por sete genes, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* e *vanZ* (Figura 1.2) (Pootoolal *et al.*, 2002, DeLisle e Perl, 2003)

O tipo VanB tem resistência adquirida a várias concentrações de vancomicina, mas é susceptível à teicoplanina, assim a resistência é apenas induzida pela vancomicina (Tabela 1.2) (Gold, 2001). Este tipo de resistência tem sido descrito em *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. raffinosus* e *E. gallinarum* (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000). O operão *vanB* é também constituído por sete genes *vanR_B*, *vanS_B*, *vanY_B*, *vanW*, *vanH_B*, *vanB*, *vanX_B* (Figura 1.2) (Pootoolal *et al.*, 2002).

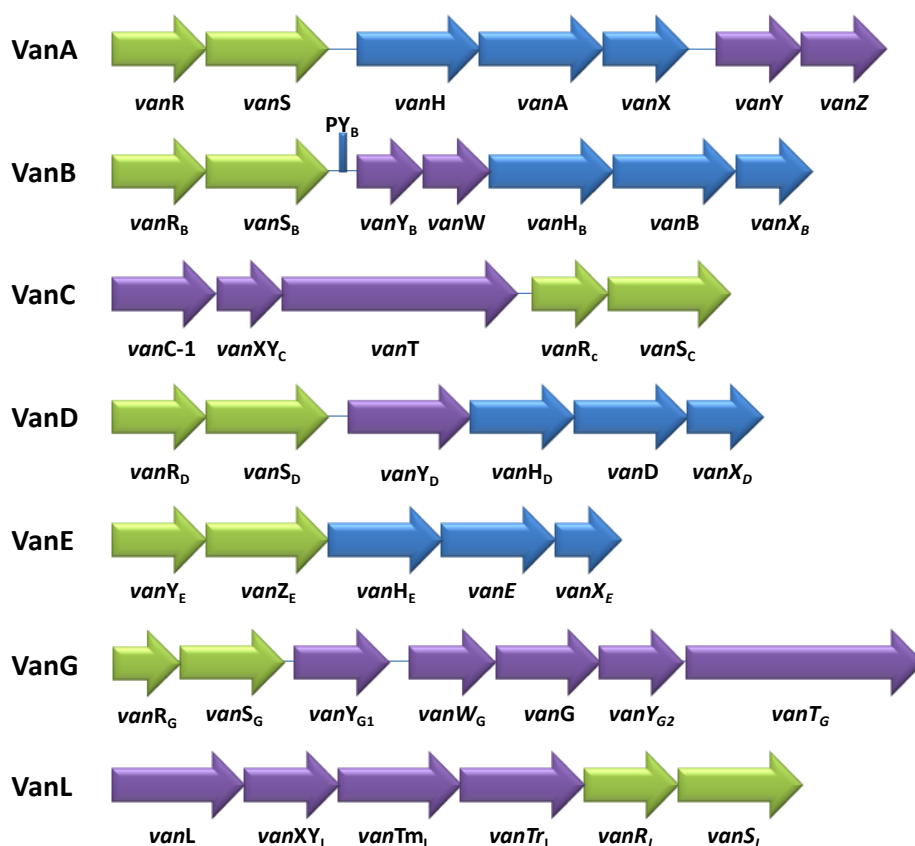


Figura 1.2 – Genes dos operões *van* que conferem resistência à vancomicina. Em cada operão estão indicados os genes associados a cada fenótipo de resistência. As setas a azul correspondem aos genes

vanHAX ou *vanHAX* equivalentes. As setas a verde correspondem aos genes *vanR* e *vanS* do sistema de dois componentes (Adaptado de Pootoolal *et al.*, 2002 e Boyd *et al.*, 2008).

Os genes *vanR_B* e *vanS_B* constituem um sistema regulador de dois componentes envolvido na transdução de sinal e é essencial para a transcrição dos genes de resposta à presença de vancomicina (Méndez-Álvarez *et al.*, 2000). Este sistema é composto pela proteína citoplasmática reguladora VanR_B, que actua como activadora transcricional e pela proteína histidina cinase VanS_B, que se encontra ligada na membrana e actua como sensora (Courvalin, 2006). A presença de vancomicina induz a autofosforilação da proteína VanS_B, que por sua vez fosforila VanR_B. O aumento da expressão de *vanR_B* e *vanS_B*, leva a que a proteína VanR_B fosforilada se ligue à região promotora P_{YB} (Figura 1.2), induzindo a transcrição dos genes do operão *vanB* (Woodford, 1998, Gold, 2001). Os genes *vanB* e *vanH_B* permitem a síntese de precursores do peptidoglicano com os resíduos terminais D-Ala-D-Lac, em vez de D-Ala-D-Ala (Figura 1.1). O gene *vanB* codifica para uma ligase que faz a ligação de D-Lac a D-Ala e o gene *vanH_B* codifica uma desidrogenase que sintetiza D-Lac a partir do piruvato (Figura 1.1). O *vanX_B* e o *vanY_B* codificam uma DD-dipeptidase e uma DD-carboxipeptidase, respectivamente. A DD-dipeptidase VanX_B hidrolisa os dipéptidos D-Ala-D-Ala sintetizados pela D-Ala-D-Ala ligase (Ddl) do cromossoma bacteriano e a DD-carboxipeptidase VanY_B, remove os resíduos D-Ala do C-terminal dos precursores do peptidoglicano quando a eliminação de D-Ala-D-Ala é incompleta (Figura 1.1). O *vanW* não contém nenhum gene homólogo ao operão *vanA* e a sua função é desconhecida (Evers e Courvalin, 1996, Marshall *et al.*, 1998, Méndez-Álvarez *et al.*, 2000, Gold, 2001, Courvalin, 2006).

A origem destes genes de resistência à vancomicina não é conhecida, mas os genes *vanHAX* têm uma sequência de aminoácidos semelhante à dos genes encontrados na espécie *Amycolatopsis orientalis*, que produz este antibiótico. As espécies intrinsecamente resistentes a este antibiótico poderão também estar na origem destes genes (Woodford, 1998, Méndez-Álvarez *et al.*, 2000, Gold, 2001).

A estirpe *E. faecalis* V583 representa o primeiro isolado clínico resistente à vancomicina reportado nos EUA e que exhibe o fenótipo VanB (Tendolkar *et al.*, 2003). Esta estirpe tem sido bastante caracterizada e foi a primeira estirpe do género *Enterococcus* cujo genoma foi totalmente sequenciado e anotado (Paulsen *et al.*, 2003).

O acesso à sequência do genoma de V583 abre novas possibilidades para a obtenção de informações relativamente à biologia molecular deste microrganismo. Uma das ferramentas que pode ser utilizada para explorar experimentalmente o genoma de *E. faecalis* é a técnica de DNA *microarrays*. Esta técnica possibilita o estudo transcricional de todos os eventos que ocorrem na célula, permitindo a identificação dos genes envolvidos em determinados processos e a obtenção de informação sobre os níveis de expressão de genes quando as condições de crescimento são alteradas (Aakra *et al.*, 2005).

Na sequência do desenvolvimento desta técnica, foram realizados estudos de transcriptómica nos quais se estudou a resposta da estirpe *E. faecalis* V583 à presença no meio de crescimento de sais biliares e do antibiótico eritromicina. Tendo-se verificado que em resposta a estes estímulos existe uma expressão diferencial de muitos genes, a maioria dos quais codifica para proteínas hipotéticas ou de função desconhecida (Flahaut *et al.*, 1996, Aakra *et al.*, 2005, Solheim *et al.*, 2007).

Outros estímulos/*stresses* que podem originar uma resposta transcricional alargada são doses sub-inibitórias de antibióticos (Davies *et al.*, 2006). Os antibióticos, independentemente dos seus receptores e modo de acção, quando em concentrações sub-inibitórias têm múltiplos efeitos na célula. Promovem a activação da transcrição de muitos genes, que por análise transcricional podem fornecer informações importantes em relação aos efeitos dos antibióticos e ao seu modo de acção. O presente estudo surge no seguimento de um estudo de transcriptómica anterior, que pretendia avaliar o nível de transcrição génica em *E. faecalis* V583 em resposta a um estímulo com uma dose terapêutica de vancomicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi verificado que 50 % dos genes cuja transcrição foi afectada, correspondem a proteínas de função desconhecida ou proteínas hipotéticas, e como tal estas proteínas poderão ter um papel importante na resposta a este tipo de estímulos. De entre os genes sobre-expressos, foram escolhidos cinco para este estudo, EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896. O EF0802 é sobre-expresso entre 19 (t10) a 26 (t30) vezes; o EF1231, 29 a 49 vezes; o EF1813, 4 a 14 vezes; o EF2292, 131 a 176 vezes e o EF2896, 14 a 28 vezes.

Este trabalho tem como principais objectivos a confirmação dos resultados dos *microarrays* por RT-PCR semi-quantitativo, a construção de mutantes em *E. faecalis* V583 Δ ABC dos genes EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896 e a expressão heteróloga em *E. coli* das proteínas hipotéticas codificadas pelos genes EF1231 e EF2292. Sendo o objectivo final deste trabalho a atribuição de uma função aos produtos dos genes estudados.

2. Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos e condições de crescimento

As estirpes de *Escherichia coli* e *E. faecalis* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 6.1 (consultar Anexo).

E. coli DH5 α e *E. coli* VE14188, foram usadas a construção de plasmídeos e propagação dos mesmos, e foram crescidas em meio *Luria-Bertani* (LB) (Oxoid), com agitação, ou LB agar (LA) (Oxoid) a 37 °C. As estirpes *E. coli* BL21, *E. coli* C41, *E. coli* C43 e *E. coli* Rosetta 2 utilizadas para a expressão de proteínas, foram crescidas em LB a 37 °C.

E. faecalis foram crescidos em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), BHI agar, meio líquido M17 suplementado com 0,5 % (w/v) de glucose (M17Glu) (BD Difco™) ou M17 agar suplementado com 0,5 % de glucose (M17AGlu) (BD Difco™) a 37 °C ou a 42 °C, sem agitação.

Os antibióticos foram utilizados nas seguintes concentrações: 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de eritromicina e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tetraciclina para *E. coli* e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de eritromicina e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tetraciclina para *E. faecalis*.

2.2 Análise de RNA

2.2.1 Extracção de RNA

Cresceu-se durante a noite a 37 °C um pré-inóculo de *E. faecalis* V583 Δ ABC em meio BHI. No dia seguinte realizou-se uma diluição de 1:20 e incubou-se a 37 °C, até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,40 – 0,45 a 600 nm. Depois dividiu-se a cultura em duas e a uma adicionou-se 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de vancomicina (Sigma). Recolheram-se 10 mL de cultura, imediatamente após a introdução de *stress* (t0), 10 min (t10) e 30 min (t30) depois da adição da vancomicina. As amostras foram imediatamente misturadas em 2 vezes o volume de *RNAprotect*® *Bacteria Reagent* (Qiagen) e a extracção de RNA total foi realizada com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as indicações do fabricante. A lise das células foi efectuada em tampão TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) contendo 15 mg.mL^{-1} de lisozima a 37 °C durante 30 min. Foram realizados dois tratamentos com DNase I, um durante a purificação de RNA, onde se realizou uma digestão com DNase na coluna usando a

RNase-Free DNase Set (Qiagen), e outro tratamento no final da extração de RNA com a *DNase I recombinant, RNase-free* (Roche). O RNA foi quantificado utilizando o *NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies).

2.2.2 Análise da expressão dos genes por RT-PCR semiquantitativo

Os resultados dos ensaios de transcriptômica foram confirmados por *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) semi-quantitativo, onde se avaliaram os níveis de expressão dos genes EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896 de *E. faecalis* V583, nos tempos t0, t10 e t30 após a adição de vancomicina.

O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa (RT) utilizando o *kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample* (Roche). Na síntese do cDNA utilizaram-se 4 µg de RNA total e *Random Hexamer Primers* disponibilizados pelo *kit*.

Em simultâneo foram preparadas amostras controlo contendo 4 µg de RNA e todos os componentes para a reacção de RT, excepto a transcriptase reversa. Estas reacções foram utilizadas como controlo de DNA que ainda poderá estar presente no RNA extraído, mesmo após os dois tratamentos com DNase.

Nas reacções de amplificação por PCR foi utilizada a *DyNAzyme™ II PCR Master Mix* (Finnzymes), segundo as indicações do fabricante.

As reacções ocorreram num volume total de 20 µL, onde se adicionou 0,5 µM de cada *primer* e 3 µL de diluições do cDNA (1:1, 1:10 e 1:100). Os *primers* para cada gene estão listados na Tabela 2.1 e as amplificações foram feitas de acordo com as condições descritas na Tabela 2.2.

Tabela 2.1 - *Primers* utilizados nas amplificações por PCR do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído.

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica (5'→ 3')	T _m (°C)	Tamanho esperado do produto amplificado (pb)
EF0802_for	GTGATAGTTCATTAAAGGAGG	54	202
EF0802_rev	GTTATGACTGAAAGCAAGGCG	57,9	
EF1231_for	CTATGCGTGGAAGATTGAGC	57,3	549
EF1231_rev	GTACCCGTACCAACAAATGC	57,3	
EF1813_for	TTACATGCCAGGCTATACGC	57,3	492

EF1813_rev	TGGACTGTCGTTTGATTGCC	57,3	
EF2292_for	TCTGCTTTATTATGCGGGCG	57,3	282
EF2292_rev	GAATCAGCAGAGCAAGAACG	57,3	
EF2896_for	ATGGCCTTGGCTTTGTTTGC	57,3	152
EF2896_rev	ACTCTGACGAACCAGATACC	57,3	

T_m – temperatura de *melting*

for e rev – *primer forward* e *primer reverse*, respectivamente

Tabela 2.2 - Programa das reacções de amplificação por PCR do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído.

Ciclos	Fase	Temperatura (°C)	Tempo
1x	Desnaturação Inicial	94	2 min
30x	Desnaturação	94	30 s
	Hibridação	T _m – 5 °C	30 s
	Polimerização	72	1 min
1x	Polimerização	72	10 min

T_m – Temperatura de *melting*

2.3 Análise de DNA

2.3.1 Extracção de DNA Cromossómico

A extracção de DNA cromossómico de *E. faecalis* V583 ΔABC foi realizada de acordo com o protocolo descrito por (Fouet e Sonenshein, 1990) com as alterações introduzidas por (Serror *et al.*, 2002).

2.3.2 Amplificação de DNA por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Os fragmentos de DNA utilizados ao longo deste trabalho foram amplificados por PCR a partir do DNA cromossómico de V583 ΔABC num termociclador T3000 *Thermocycler* (Biometra). Todos os *primers* utilizados neste trabalho foram desenhados a partir da sequência publicada de *E. faecalis* V583 (Paulsen *et al.*, 2003). As sequências de cada um dos *primers* usados na construção dos mutantes e os *primers* utilizados nas construções para os ensaios de sobre-expressão, assim como o tamanho dos fragmentos esperados estão descritos na Tabela 2.3 e Tabela 2.4, respectivamente. Os *primers* específicos para cada vector utilizado

estão descritos na Tabela 2.5. Os programas utilizados em cada reacção de PCR estão descritos na Tabela 2.6.

As reacções de amplificação dos fragmentos utilizados na construção de mutantes por deleção e nas construções para a sobre-expressão de proteínas foram realizadas com as enzimas *Taq* DNA Polimerases *Easy-A*[®] *High-Fidelity PCR Cloning Enzyme* (Stratagene) ou *Expand High Fidelity*^{PLUS} *Enzyme* (Roche), de acordo com as indicações dos fabricantes. Estas enzimas apresentam actividade de exonuclease 3'→5' que diminui a ocorrência de erros durante a amplificação. Por outro lado, possuem actividade de *terminal transferase* e como tal adicionam à extremidade 3' uma desoxiadenosina permitindo a clonagem T-A no vector pGEM®-T (Promega), que possui um resíduo de timidina na extremidade 3'.

Resumidamente, as reacções ocorreram num volume total de 50 µL onde se utilizou aproximadamente 100 ng de DNA, 0,4 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), tampão 1x e 2,5 U de *Easy-A*[®] *High-Fidelity* ou *Expand High Fidelity*^{PLUS}.

As reacções para a obtenção dos fragmentos usados na construção de mutantes por inserção foram realizadas com a utilizando a *DyNAzyme*TM *II PCR Master Mix*, num volume de 50 µL com 0,2 µM de cada *primer* e cerca de 100 ng de DNA.

As reacções a partir de colónia foram efectuadas com a *DyNAzyme*TM *II PCR Master Mix*, num volume total de 20 µL e segundo as instruções do fabricante.

Tabela 2.3 – Sequência dos *primers* utilizados na construção de mutantes e tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Primers	Sequência nucleotídica 5'→3'	T _m (°C)	Tamanho esperado (pb)
EF1231	EF1231_1	GTGGCGAGAACAAGAATACG	57,3	1015
	EF1231_2	AAATAAGAGCATTATACTTAAACC	52,5	
	EF1231_3	<u>GGTTTAAGTATAATGCTCTTATTTG</u> GAACGACCGCCATTCATGC	71,3	1062
	EF1231_4	GTTCGATCCCAATAAACCGC	57,3	
EF1813	EF1813_1	ATGTACCGATCATTGCTGCG	57,3	1054
	EF1813_2	<u>GGTTGCACTTCTTGGAATCCAATT</u> TCTCGCTGGAGACTGC	73,6	
	EF1813_3	GGATTCCAAGAAGTGCAACC	57,3	1132
	EF1813_4	TAATCGGAGGAATGGATGCC	57,3	

EF2292	EF2292_1	TTCGGGCTGTGAGGTCGG	60,5	1131
	EF2292_2	<u>CCTTCAACGAAAACCCGAATCAAA</u> GCAGATTCCATCAGCGC	73,4	
	EF2292_3	GATTCGGGTTTTCGTTGAAGG	57,9	1163
	EF2292_4	TTTGAAGCAGGCGAGTTACC	57,3	
	EF2292_5	ACGGAAGAACTAAACGCTGC	57,3	1651 ^{b)} / 1363 ^{c)}
	EF2292_6	CCGAATGTCCTGTTTCAAGC	57,3	
EF0802	tim_0802_for	AGTGATAGTTCATTAAAGGAGG	74,2	251
	tim_0802_rev	TGTGATTGTTATGACTGAAAGC	73,3	
EF2896	tim_2896_for	ATGGCCTTGGCTTTGTTTGC	>75	191
	tim_2896_rev	TCTGACGAACCAGATACCTG	>75	
-	Otf1 ^{d)}	TACCTAC <u>CTGCAG</u> GAGGGGAC	58	-
-	Otf2 ^{e)}	TACTAC <u>CCTAGG</u> GTGGGCAG	56	-

a) As sequências a sublinhado correspondem à cauda que foi adicionada e que corresponde à sequência complementar do *primer* 2 ou 3.

b) Tamanho molecular do fragmento esperado para a estirpe com o gene EF2292 *wild-type*.

c) Tamanho molecular do fragmento esperado para a estirpe com o gene EF2292 mutante.

d) *Primer* adicionado à extremidade 5' dos *primers* EF0802 e EF2896 *forward*. A sequência a sublinhado corresponde ao local de restrição para a enzima SbfI.

e) *Primer* adicionado à extremidade 5' dos *primers* EF0802 e EF2896 *reverse*. A sequência sublinhada corresponde ao local de restrição para a enzima AvrII.

Tabela 2.4 – Sequência dos *primers* utilizados na expressão de proteínas e tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Primers	Sequência nucleotídica 5'→ 3'	Tm (°C)	Fragmento (pb)
EF1231	Over1231_for	GAAAGGAGCGCATATGGTGGTTAAAAA	61,9	853
	Over1231_rev	CGACCAGGATCCTTAAATATAGATAGTAAAATG	63,3	
EF1813	Over1813_for	GGAAAGGAAGACAACTCATATGAAAAAAA	59,9	2322
	Over1813_rev	CTTCTTAGGATCCCTATGGCGTAGTCG	66,5	
EF2292	Over2292_for	CATCAGACCAATTCATATGTTGTTTACAG	61	378
	Over2292_rev	CAGCTACTGGATCCTCAACGAAAACC	64,8	
EF2896	Over2896_for	GAGAGGAACATATGTTGTTAGAAAAATAC	59,6	237
	Over2896_rev	TTTAGGACAGGGATCCTTAATTCTTTCTT	61	

a) As sequências a sublinhado correspondem aos locais de restrição das enzimas NdeI e BamHI, adicionados aos *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

Tabela 2.5 – Sequência dos *primers* a montante e a jusante do local de clonagem múltipla de cada um dos plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Primers	Sequência nucleotídica 5'→ 3'	T _m (°C)
pGEM [®] -T/ pG+host9	1224dd	CAGGGTTTTCCCAGTCACG	58,8
pGEM [®] -T	1233	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	59,3
pG+host9	Ori1	CTGACAGCTTCCCAAGGAG	56
pVE14218	OEF102	CGGCGATCGGACTAAACAATTGAACACGGC	60
	OEF106	TGATGAAACGGCAGGATAG	60
pET-15b	pET-15b_f	GATATAGTTCCTCTTTCAGC	55,9
	pET-15b_r	CATCATCATCATCACAGC	55,9

Tabela 2.6 – Programa das reacções de PCR utilizadas para a amplificação dos diferentes fragmentos de DNA.

Ciclos	Fase	Temperatura (°C)	Tempo
1x	Desnaturação Inicial	94 ^{a)} /95 ^{b)}	2 / 5 ^{c)} / 10 ^{d)} min
35x	Desnaturação	94 ^{a)} /95 ^{b)}	30 s
	Hibridação	T _m – 5 °C	30 s
	Polimerização	72	1 a 3 min
1x	Polimerização	72	7 ^{a)} / 10 ^{b)} min

a) Condições utilizadas para a enzima *High Fidelity*^{PLUS}.

b) Condições utilizadas para a enzima *Easy-A*[®] *High-Fidelity* e para o PCR de colónia

c) Tempo de desnaturação inicial para PCR de colónia a partir de *E. coli*.

d) Tempo de desnaturação inicial para PCR de colónia a partir de *E. faecalis*.

2.3.3 Separação de fragmentos de DNA por electroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados por PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose de 1 % ou 2 % (consoante o tamanho dos produtos de PCR fosse superior ou inferior a cerca de 500 pb, respectivamente) em solução tampão TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Os géis de agarose foram corados com uma solução de *GelRed Nucleic Acid Stain* (3x) (Biotium) e visualizados através de radiação ultravioleta com o sistema Kodak 1D 3.6 (Kodak). A migração das moléculas de DNA amplificadas foi avaliada por comparação

com os marcadores de massa molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen) ou *FastRuler™ DNA Ladder* (Fermentas).

2.3.4 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR para clonagem em vectores foram purificados directamente da reacção de PCR, quando apenas se obteve uma banda com tamanho correspondente ao pretendido, ou a partir da banda de gel com o tamanho pretendido, após electroforese em gel de agarose 0,8 % (*Agarose Low Melting Point*) (Promega) em TAE 1x. Os fragmentos foram purificados com o kit *Nucleospin Extract II* (Macherey-Nagel).

2.3.5 Preparação de misturas de Ligação

Os produtos da amplificação por PCR foram ligados ao vector pGEM[®]-T (Promega) numa reacção com volume total de 10 µL e de acordo com as indicações do fabricante. Utilizou-se 1 µL de vector (50 ng), 5 µL de tampão de ligação (2x), 1 µL de T4 DNA ligase (3U) e a quantidade de inserto foi calculada segundo as recomendações do fabricante e de modo a se obter uma proporção de 3:1 (inserto:vector). As ligações foram mantidas a 4 °C durante a noite.

O fragmento que foi digerido do pGEM[®]-T, após sequenciado, foi ligado ao vector pG+host9 (Maguin *et al.*, 1996) numa reacção de 10 µL, em 5 µL de tampão de ligação (2x) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3U) (Promega). A ligação foi efectuada a 4 °C, durante a noite.

As ligações ao plasmídeo pVE14218 e pET-15b foram efectuadas com o *Kit Rapid DNA Dephos & Ligation* (Roche), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em suma, os vectores digeridos foram desfosforilados numa reacção de 20 µL, que continha cerca de 500 ng de DNA plasmídico, tampão (1x) e 1U de fosfatase alcalina e foi incubada a 37 °C durante 30 min. A fosfatase alcalina foi inactivada a 75 °C durante 2 min. Nas ligações utilizaram-se 50 ng de DNA do vector desfosforilado e 150 ng de inserto digerido, numa mistura de 20 µL que foi incubada à temperatura ambiente durante 5 min. A ligação foi usada directamente na transformação.

2.3.6 Extracção de DNA plasmídico

O DNA plasmídico dos clones que continham o inserto pretendido foi extraído através do sistema de colunas *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Macherey-Nagel), segundo as indicações do fabricante.

Os produtos de PCR clonados foram sequenciados pela empresa STAB-Vida. Os diferentes plasmídeos foram sequenciados utilizando *primers* universais (M13fwd e M13rev) e *primers* desenhados (consultar Anexo, Tabela 6.2) de modo a que a sequenciação abranja o fragmento todo e sejam sequenciadas as duas cadeias de DNA. Os resultados de sequenciação foram analisados com o programa *Vector NTI Advance™* (Invitrogen).

2.4 Preparação de células competentes e transformação

2.4.1 Preparação de células electrocompetentes e transformação por electroporação

As células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α , *E. coli* VE14188 e *E. faecalis* V583 Δ ABC foram preparadas segundo os protocolos descritos por (Dower *et al.*, 1988) e (Dunny *et al.*, 1991), para *E. coli* e *E. faecalis*, respectivamente.

As transformações foram efectuadas com 50 μ L de células electrocompetentes e com aproximadamente 50 ng de plasmídeos recombinantes ou 5 μ L de mistura de ligação.

Na transformação por electroporação utilizou-se o aparelho *Gene Pulser Xcell* (Bio-Rad) a 25 μ F 200 Ohm e 2,5 KV.

2.4.2 Preparação de células competentes e choque térmico

As células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), *E. coli* C41 (DE3) (Novagen), *E. coli* C43 (DE3) (Novagen) e *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen), foram preparadas usando o método descrito por (Chung *et al.*, 1989), que utiliza *Transformation and Storage Solution* (TSS) e *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (Sigma).

Em cada transformação utilizaram-se, 200 μ L de células ressuspendidas em TSS e 10 μ L de cada mistura de ligação ou 50 a 100 ng dos plasmídeos recombinantes purificados. Incubou-se em gelo durante 45 min, após os quais se efectuou o choque térmico de 90 s a 42 °C e 2 min no gelo. Adicionaram-se 800 μ L de meio SOC (Bacto-triptona 20 g.L⁻¹;

extracto de levedura 5 g.L⁻¹ NaCl 0,25 M; KCl 0,06 M; MgCl 0,25 M; MgSO₄ 0,25 M) e incubou-se a 37 °C com agitação suave durante uma hora. Plaquearam-se 150 µL e 200 µL em placas de meio sólido LB com ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e adicionalmente cloranfenicol (34 µg.mL⁻¹) (Sigma), no caso da estirpe *Rosetta* 2. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

2.5 Construção de mutantes de *E. faecalis* V583 ΔABC

Os mutantes foram construídos na estirpe *E. faecalis* V583 ΔABC. Esta estirpe foi utilizada uma vez que foi curada dos seus três plasmídeos (pTEF1, pTEF2 e pTEF3), que estão presentes na estirpe selvagem *E. faecalis* V583, e como tal contam menos resistências a antibióticos. Esta característica vai facilitar a construção dos mutantes.

2.5.1 Construção de mutantes por deleção

2.5.1.1 Obtenção dos fragmentos I, II e III

Na construção de mutantes por deleção dos genes EF1231, EF1813 e EF2292 utilizou-se o protocolo descrito anteriormente por (Brinster *et al.*, 2007).

A estratégia utilizada consistiu na amplificação de dois fragmentos de DNA (fragmentos I e II) que englobam as regiões cromossómicas (~ 1 kb), a montante e a jusante do gene de interesse. O fragmento III, que resulta da junção dos fragmentos I e II, foi delineado com o objectivo de substituir a zona homóloga no cromossoma bacteriano. A finalidade é a troca, por recombinação homóloga, do gene selvagem pela sequência presente no fragmento III, onde se eliminou entre 80 a 90 % do gene.

Por exemplo, no caso do mutante ΔEF2292 os PCR I e II originam os fragmentos I e II, que foram obtidos por PCR com um *primer* externo (1 ou 4) e um interno (2 ou 3) (*primers* descritos na Tabela 2.3), como está exemplificado no esquema da Figura 2.1. O *primer* 2 (ou 3) contém na extremidade 5' a sequência complementar do *primer* 3 (ou 2) (Figura 2.1). Assim, os fragmentos produzidos têm extremidades complementares que irão facilitar a junção dos fragmentos. Posteriormente, realizou-se um terceiro PCR (PCR III) com os fragmentos I e II e com os *primers* externos, para se obter o fragmento III (Figura 2.1).

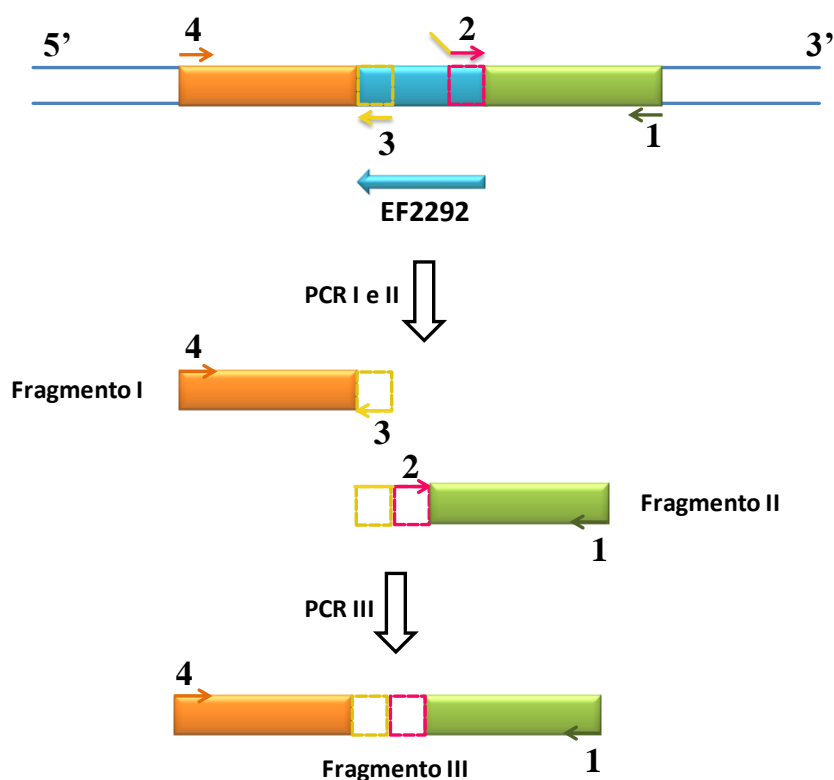


Figura 2.1 – Esquema exemplificativo da estratégia usada para obtenção dos fragmentos I, II e III. Os primers 1 e 4 são primers externos e os primers 2 e 3 são primers internos. Os primers 2 e 4 são complementares à cadeia 5'→3' e os primers 1 e 3 são complementares à cadeia 3'→5'. O primer 2 tem uma “cauda” que corresponde à sequência complementar do primer 3.

2.5.1.2 Clonagem dos produtos de PCR nos vetores pGEM®-T e pG+host9

Os fragmentos III foram directamente ligados ao vector de clonagem pGEM®-T. O pGEM®-T contém o gene *bla*, que confere resistência à ampicilina, permitindo a selecção dos clones que contêm o plasmídeo. Este plasmídeo é fornecido sob a forma linear, apresentando um resíduo de timidina na extremidade 3', o que promove uma maior eficiência na ligação dos produtos de PCR ao vector. Este vector possui o gene *lacZ* que codifica para a β-galactosidase e que permite a diferenciação dos clones recombinantes dos não recombinantes, pelo aparecimento de colónias de cor branca ou azul, respectivamente, quando na presença de *Isopropyl b-D-1-Thiogalactopyranoside* (IPTG) e X-Gal. A inserção de um fragmento de DNA na região de clonagem múltipla, interrompe o gene *lacZ*, resultando no aparecimento de colónias brancas.

As colónias brancas foram repicadas para novas placas de meio LB com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e o *screening* dos recombinantes foi realizado por PCR de colónia com os *primers* 1233 e 1224dd (Tabela 2.5). Dos clones recombinantes, para os quais se amplificou por PCR um fragmento com peso molecular próximo do esperado, foi escolhido um que foi sequenciado. Após confirmação que a sequência do fragmento ΔEF2292 clonada era a prevista e verificação da sua orientação, removeu-se o inserto do vector de clonagem por restrição enzimática com as enzimas SalI (Biolabs) e SacII (Biolabs). O fragmento ΔEF2292 foi clonado no pG+host9, previamente linearizado com as enzimas de restrição SacII e XhoI (Biolabs), dando origem ao plasmídeo recombinante pG+host9/ ΔEF2292 . O pG+host9, utilizado na construção de mutantes por deleção, é um plasmídeo termosensível (RepATs) e a sua replicação é condicionada pela temperatura. Como tal, replica-se a 27°C , mas é incapaz de se replicar a 37°C ou a 42°C , pois a proteína RepA não está funcional a estas temperaturas. Este plasmídeo foi escolhido para a construção dos mutantes, uma vez que tem a capacidade de se integrar no cromossoma de bactérias Gram-positivas (integra-se a 42°C). O pG+host9 contém ainda o gene *ermC*, que confere resistência à eritromicina, permitindo a selecção dos clones bacterianos com plasmídeo.

Procedeu-se à transformação por electroporação da estirpe de *E. coli* VE14188 (Anexo, Tabela 6.1) e os transformantes foram seleccionados a 37°C em meio LA com eritromicina ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e timina (0,25 %). Esta estirpe codifica uma proteína RepA (*repA*⁺) que vai permitir a replicação do plasmídeo pG+host9 a 37°C . Foi realizado o *screening* dos transformantes pG+host9/ ΔEF2292 por PCR de colónia com os *primers* 1224dd e Ori1 (Tabela 2.5) e com os *primers* específicos para o inserto EF2292_1 e E2292_4 (Tabela 2.3).

2.5.1.3 Selecção dos transformantes *single crossing-over* (SCO) e *double crossing-over* (DCO)

Após confirmação dos transformantes de *E. coli*, escolheu-se um clone e purificou-se o pG+host9/ ΔEF2292 . Em seguida, transformou-se a estirpe V583 ΔABC com cerca de 50 ng do plasmídeo recombinante e incubou-se 2 horas a 27°C , em meio M17Glu com sacarose (0,5M), MgCl_2^{2+} (1M) e CaCl_2^{2+} (1M). Os transformantes foram seleccionados em M17AGlu com eritromicina ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (M17AGluEry), à temperatura permissiva de

27 °C durante 48 horas. Realizou-se novamente o *screening* dos transformantes por PCR de colónia com os *primers* 1224dd e Ori1.

A integração do plasmídeo recombinante (SCO) no cromossoma da bactéria e a sua excisão (DCO) do cromossoma foram realizados como descrito (Brinster *et al.*, 2007). Inoculou-se uma cultura de V583 Δ ABC contendo o plasmídeo pG+host9/ Δ EF2292, à temperatura permissiva (27 °C) durante 2 horas, em meio M17Glu. Depois incubou-se durante 2 horas à temperatura não permissiva (42 °C), de modo a favorecer a integração do plasmídeo. Plaquearam-se várias diluições da cultura em meio M17AGluEry e incubou-se a 42 °C durante a noite, para seleccionar os integrantes. Os integrantes foram confirmados por PCR de colónia com os *primers* EF2292_5/EF2292_6 (Tabela 2.3).

A excisão do plasmídeo por um segundo evento de recombinação foi promovida por várias passagens para novos meios de cultura, onde se efectuou o crescimento de um dos clones integrantes em meio M17Glu a 27 °C. Plaquearam-se várias diluições em M17AGlu e M17AGluEry e incubou-se a 42 °C durante a noite. As colónias das placas sem antibiótico foram repicadas, em paralelo, para meio com e sem eritromicina, de modo a ser possível a identificação das colónias sensíveis ao antibiótico. Os mutantes com a deleção no gene EF2292 foram identificados por PCR de colónia com os *primers* EF2292_5 e EF2292_6 e confirmados por *Southern blotting*.

2.5.2 Construção de mutantes por inserção de uma cassette de resistência à tetraciclina

Os mutantes nos genes EF0802 e EF2896 que se pretendeu obter por inactivação, através da inserção de uma cassette de resistência à tetraciclina no cromossoma de V583 Δ ABC foram construídos com base num protocolo ainda não publicado e optimizado no âmbito de um projecto em curso.

Inicialmente pretendeu-se construir estes mutantes por deleção. No entanto, foram encontradas algumas dificuldades na realização dos PCR I e II, não tendo sido possível obter os respectivos fragmentos. As dificuldades encontradas poderão estar relacionadas com o baixo conteúdo G+C e com o reduzido tamanho das sequências de EF0802 e EF2896. Assim, optou-se por mudar de estratégia e construir os mutantes por inactivação dos genes.

2.5.2.1 Clonagem dos produtos de PCR no vector pVE14218

A estratégia adoptada utiliza os *primers* Otf1 (Tabela 2.3) e Otf2 (Tabela 2.3) que foram adicionados à extremidade 5' de cada um dos *primers forward* e *reverse* (Tabela 2.3), respectivamente. O *primer* Otf1 contém o local de restrição para a enzima AvrII e o *primer* Otf2 para a enzima SbfI.

Os fragmentos internos dos genes EF0802e EF2896 (Figura 2.2), usados na construção dos mutantes de inserção, foram digeridos com as enzimas de restrição AvrII (Fermentas) e SbfI (Fermentas) e clonados no vector pVE14218 digerido com as enzimas NsiI (Fermentas) e SpeI (Fermentas). O pVE14218 contém o gene *tetM* que confere resistência a tetraciclina.

As construções foram primeiro introduzidas em *E. coli* VE14188, para amplificação dos plasmídeos, e os clones positivos foram seleccionados em meio LB com tetraciclina (12,5 µg.mL⁻¹) e timina, a 37 °C durante 24 horas. Os plasmídeos recombinantes foram identificados por PCR de colónia com os *primers* OEF102 e OEF106 (Tabela 2.5).

As células de *E. faecalis* VE14412, foram transformadas por electroporação com os plasmídeos pVE14218/EF0802 e pVE14218/EF2896 e incubadas em meio sólido M17Glu e tetraciclina (10 µg.mL⁻¹) (M17AGluTet) a 27 °C durante 48 horas.

2.5.2.2 Selecção dos integrantes por choque térmico

Inoculou-se uma colónia da estirpe transformante *E. faecalis* VE14412 em 50 mL de M17Glu e incubou-se a 27 °C durante 2 horas. Depois realizou-se o choque térmico a 42 °C durante 2 horas. Os clones com o plasmídeo integrado no genoma foram seleccionados em M17AGluTet e incubados a 42 °C durante 48 horas.

Para confirmar que o plasmídeo se inseriu no gene que se pretendia inactivar e que não está inserido noutra local do genoma e para determinar se houve inserção de uma cópia ou de múltiplas cópias do plasmídeo, realizou-se uma análise por *Southern blotting*.

2.6 Análise por *Southern blotting*

2.6.1 Restrição enzimática de DNA cromossómico

Realizou-se uma digestão enzimática de 1,5 µg de DNA cromossómico extraído de *E. faecalis* ΔABC (controlo) e dos possíveis mutantes de EF0802 e EF2896 por inserção de uma

cassete de tetraciclina, com as enzimas de restrição BsaAI (fermentas) e EcoRI (fermentas), respectivamente. As enzimas foram escolhidas tendo em conta a ausência de local de restrição na sequência dos genes EF0802 e EF2896. As reacções ocorreram num volume total de 30 µL durante 2 horas a 30 °C (BsaAI) ou 37 °C (EcoRI), de acordo com as indicações do fabricante. As enzimas utilizadas foram escolhidas segundo o esquema da Figura 2.2.

Dos clones que foram identificados por PCR como sendo possíveis mutantes de *E. faecalis* V583 ΔABC ΔEF2292, escolheram-se cinco (ΔEF2292 #5, #14, #17, #21 e #23), para confirmação por *Southern blotting*. Procedeu-se a uma restrição enzimática de 1,5 µg de DNA cromossómico de cada um dos mutantes ΔEF2292 e da estirpe selvagem, em duas reacções enzimáticas diferentes (Digestão I e II). Na digestão I, utilizaram-se as enzimas BmtI (Biolabs), BsrGI (Biolabs) e NcoI (Biolabs) e na digestão II, usaram-se as enzimas Nsi (Biolabs) e Bpu10I (Biolabs). As enzimas foram escolhidas de acordo com o esquema da Figura 2.3.



Figura 2.2 – Representação esquemática da posição das enzimas de restrição usadas na digestão dos possíveis mutantes EF0802 (A) e EF2896 (B), com BsaAI e EcoRI, respectivamente. (A) A digestão com BsaAI resulta num fragmento de 572 pb, sem o plasmídeo pVE14218 inserido. (B) A digestão com EcoRI resulta num fragmento de 1779 pb, sem plasmídeo inserido. As setas a azul indicam o sentido dos genes no cromossoma bacteriano e as setas a vermelho indicam os locais de corte para as enzimas EcoRI e BsaAI. A roxo estão representados os fragmentos internos inseridos no pVE14218, o EF0802 (210 pb) e o EF2896 (150 pb).

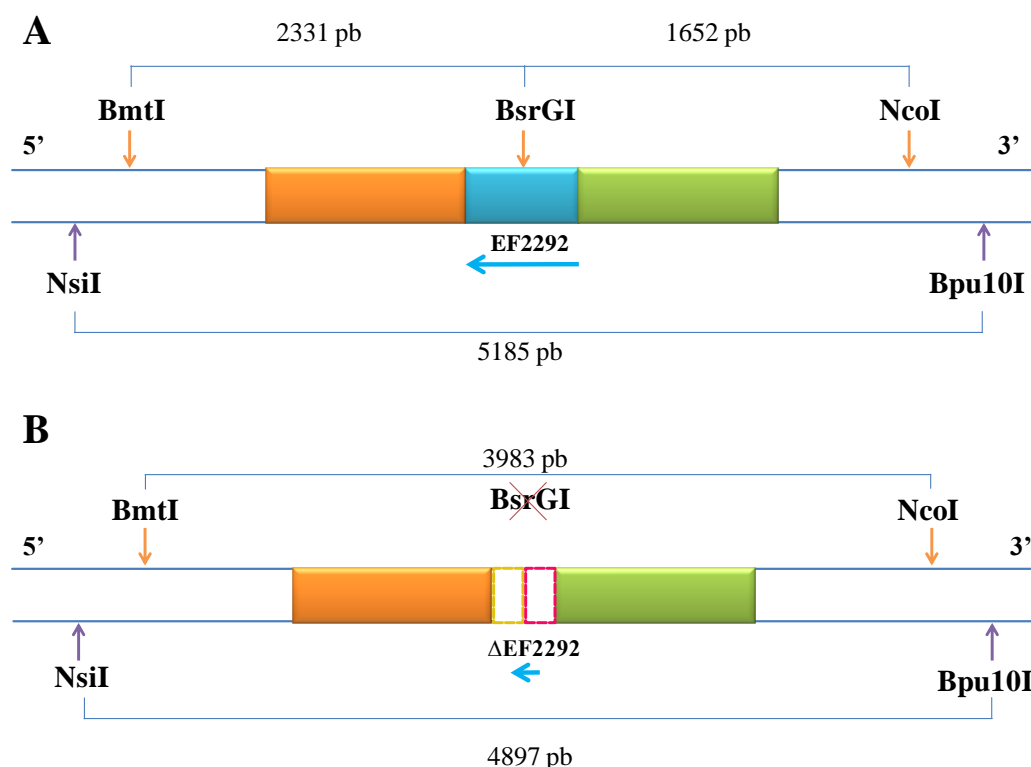


Figura 2.3 – Representação esquemática da posição das enzimas de restrição usadas na digestão I (enzimas BmtI, BsrGI e NcoI) e digestão II (enzimas NsiI e Bpu10I), e que foram utilizadas para confirmar o mutante EF2292 por *Southern blotting*. (A) Locais de corte das enzimas de restrição para a estirpe sem mutação no gene EF2292. A digestão I dá origem a 2 fragmentos, um de 2331 pb e outro de 1652 pb. A digestão II dá origem a um fragmento de 5185 pb. (B) Locais de corte das enzimas de restrição para as estirpes com deleção no gene EF2292. A digestão I dá origem a um fragmento de 3983 pb, devido à perda do local de restrição da enzima BsrGI. A digestão II dá origem a um fragmento de 4897 pb. A seta a azul indica o sentido do gene no cromossoma.

2.6.2 Transferência

O DNA total digerido foi separado num gel de agarose 1 % em TAE 1x e transferido para uma membrana de *nylon* carregada positivamente, *Amersham Hybond™-N⁺* (GE Healthcare), por *Southern blotting*. O gel foi colocado numa solução de HCl 0,25 N durante 15 min para permitir a depurinação do DNA. Incubou-se depois, 2 vezes durante 15 min em tampão de transferência (NaOH 0,4 M; NaCl 0,6 M) para permitir a desnaturação.

2.6.3 Hibridação

A hibridação e detecção foi realizada usando o *kit DIG DNA Labeling and Detection* (Roche), de acordo com as indicações do fabricante. As sondas de DNA foram marcadas com digoxigenina (DIG) por *Random priming* com a enzima *Klenow fragment* na presença de hexâmeros e com uma mistura de dNTPs e Dig-dUTP (Digoxigenina). Para confirmar os mutantes por inserção de uma cassette de tetraciclina, utilizou-se como sonda o plasmídeo pVE14218 previamente linearizado. No caso do mutante V583 Δ ABC Δ EF2292 foi utilizado como sonda o fragmento III.

2.6.4 Detecção

A detecção das sondas hibridadas foi efectuada por uma reacção colorimétrica com um anticorpo específico para a DIG, acoplado a uma fosfatase alcalina e que origina uma cor púrpura na presença do substrato NBT/BCIP que reage com a fosfatase alcalina.

2.7 Estudo do mutante *E. faecalis* V583 Δ ABC Δ EF2292

2.7.1 Teste de susceptibilidade a diferentes antibióticos

Determinou-se a susceptibilidade dos mutantes Δ EF2292 a vários antibióticos em paralelo com a estirpe selvagem, pelo método de difusão em disco. As culturas foram crescidas durante a noite a 37 °C em meio sólido BHI, e as colónias isoladas foram ressuspendidas em meio líquido *Mueller-Hinton* (MHB) (Oxoid), ajustou-se à escala padrão de 0,5 de McFarland (bioMérieux). Esta suspensão serviu para inocular com uma zaragatoa em meio *Mueller-Hinton* agar (MHA). Os discos com antibiótico (Oxoid) (Tabela 2.7) foram colocados nas placas a uma distância de pelo menos 24 mm do centro de cada disco. Após incubação a 37 °C durante 24 horas, os diâmetros das zonas onde houve inibição do crescimento bacteriano foram medidos.

Tabela 2.7 – Antibióticos utilizados nos testes de sensibilidade e a respectiva carga de cada antibiótico.

Antibiótico	Dose de antibiótico no disco	Antibiótico	Dose de antibiótico no disco
Ampicilina	10 µg	Imiperem	10 µg
Bacitracina	10 U	Lincomicina	15 µg
Cefoperazona	30 µg	Meticilina	5 µg
Ciprofloxacina	5 µg	Penicilina G	10 U
Cloranfenicol	30 µg	Sulfametoxazol/Trimetoprim	25 µg
Eritromicina	15 µg	Tetraciclina	30 µg
Gentamicina	10 µg	Vancomicina	30 µg

2.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a vancomicina

Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a vancomicina pelo método Etest® (Biodisk), de acordo com as indicações do fabricante. Cresceu-se durante a noite a 37 °C, sem agitação e em meio líquido BHI, uma cultura de cada um dos 5 clones do mutante ΔEF2292, que foram confirmados por *Southern-blotting*, e da estirpe *wild-type* V583 ΔABC. No dia seguinte riscou-se cada uma das estirpes para placas de meio sólido BHI e incubou-se a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, ressuspenderam-se colónias isoladas em meio BHI e ajustou-se à escala 2 de *McFarland*. Inoculou-se, por espalhamento com uma zaragatoa, em meio BHI agar e aplicaram-se as fitas de *Etest*® de vancomicina. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas, após as quais se fez a leitura do halo de inibição.

2.7.3 Curvas de crescimento

Para estudar o efeito da deleção do gene EF2292 no crescimento, foram realizadas curvas de crescimento do mutante e da estirpe *wild-type*, na ausência e após a adição de vancomicina ao meio de crescimento. As estirpes foram inoculadas em BHI numa diluição final de 1:100 e incubadas a 37 °C. Mediu-se a DO de vários pontos, ao longo da curva de crescimento, por espectrometria a 600 nm (espectrofotómetro UV/Visível *Ultrospec 2100 pro*

(Amersham Pharmacia)). A vancomicina foi adicionada na concentração final de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a uma das culturas quando esta atingiu a DO entre 0,30 e 0,35 (início da fase exponencial).

2.8 Expressão das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292

2.8.1 Análise das Sequências

Foram pesquisadas nas sequências nucleotídicas a montante dos genes EF1231 e EF2292, sequências características de locais de ligação ao ribossoma (RBS).

As sequências de aminoácidos das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292 foram analisadas recorrendo a ferramentas bioinformáticas disponibilizadas *online*. Utilizaram-se os programas SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) (Hirokawa *et al.*, 1998) e TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.*, 2001) para prever a existência de sequências transmembranares e o SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para prever sequências sinal.

Foi ainda utilizada a ferramenta GCUA: *Graphical Codon Usage Analyser* (<http://gcua.schoedl.de/>), para verificar a ocorrência nas sequências dos genes EF1231 e EF2292 de codões cujos tRNAs são pouco abundantes em *E. coli*.

2.8.2 Clonagem de DNA no vector pET-15b

Os fragmentos de DNA correspondentes às regiões codificantes dos genes cujas proteínas se pretende expressar, EF1231 e EF2292, foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI (Biolabs) e BamHI (Biolabs) e inseridos no vector de expressão pET-15b (Novagen), digerido previamente com as mesmas enzimas. Este plasmídeo contém o gene *bla* que confere resistência à ampicilina, característica que foi utilizada para seleccionar os clones que continham o pET-15b recombinante (pET-EF123 e pET-EF2292). Transformou-se, por choque térmico, a estirpe BL21 e os clones recombinantes foram seleccionados em meio LA com ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a 37°C durante a noite. A presença dos insertos com o peso molecular pretendido foi confirmada por PCR de colónia com os *primers* pET-15b_f e pET-15b_r (Tabela 2.5). A correcta sequência dos fragmentos clonados foi confirmada por sequenciação. As estirpes C41, C43 e *Rosetta* 2, foram transformadas com os plasmídeos purificados e a selecção dos

transformantes foi realizada em meio LA com ampicilina, no caso da *Rosetta 2*, foi também adicionado ao meio 34 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloranfenicol. Incubou-se a 37 °C durante a noite. A presença dos plasmídeos recombinantes foi novamente confirmada por PCR de colônia.

2.8.3 Ensaios de Expressão

As várias estirpes de *E. coli* contendo os plasmídeos pET/EF1231 e pET/EF2292 foram inoculadas em 5 mL de LB contendo ampicilina e quando necessário cloranfenicol (*E. coli Rosetta 2*), e incubadas a 37 °C durante a noite, com agitação (220 rpm). Esta cultura foi utilizada para inocular 100 mL de LB (diluição de 1 mL em 50 mL) contendo o(s) antibiótico(s) e incubada a 37 °C com agitação, até atingir uma densidade óptica entre 0,60 e 0,70 a 600 nm. A expressão foi induzida com 0,5 mM de IPTG (Promega) e incubação a 37 °C durante 4 horas. As células foram recolhidas a 4 °C por centrifugação a 5000 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram congelados a -80 °C.

2.8.4 Análise por SDS-PAGE

2.8.4.1 Preparação das amostras

Na preparação das amostras utilizaram-se 2 μL de cada uma das culturas, 1 μL de agente redutor (Bio-Rad), 1,5 μL de SDS 20 % (w/v), 2,5 μL *Premixed Sample Loading Buffers* (Bio-Rad) e 3 μL de água.

2.8.4.2 SDS-PAGE

As proteínas foram separadas por *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), num gel de poliacrilamida de 12 % e utilizando o sistema *Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System* (Bio-Rad) a 180 V, durante 50 min. Utilizou-se como referência o marcador de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range* (Bio-Rad). As proteínas sobre-expressas, contendo a cauda de histidinas, foram imuno-detectadas usando o reagente de fixação *InVision™ His-tag In-gel Stain* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O gel foi visualizado por fluorescência com o

sistema *FujiFilm* FLA-5100 e em seguida, o gel foi corado com *Coomassie brilliant blue* R250 (Bio-Rad), para visualização da proteína total, durante 30 min à temperatura ambiente e com agitação constante. O gel foi descorado com uma solução de descoloração (7,5 % de ácido acético e 20 % de etanol).

3. Resultados

3.1 Análise da expressão por RT-PCR semi-quantitativo

Com o objectivo de confirmar os níveis de expressão dos genes EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896 de *E. faecalis* V583, observada nos ensaios de *microarrays* após *stress* com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vancomicina, realizou-se uma análise por RT-PCR semi-quantitativo. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 3.1, os controlos para o DNA não são apresentados, no entanto a quantidade de produto detectado foi sempre muito inferior à quantidade do produto de PCR detectado para o cDNA.

Na presença de vancomicina a expressão de todos os genes testados foi superior à expressão na ausência de vancomicina, confirmando os resultados dos ensaios de transcriptómica. Na presença de vancomicina, a expressão aumenta do t0 ao t30 após a imposição de *stress*, confirmando os resultados observados nos ensaios de *microarrays*. Na ausência de *stress*, os níveis de expressão parecem se manter semelhantes do t0 ao t30, à semelhança do que foi observado nos ensaios de transcriptómica.

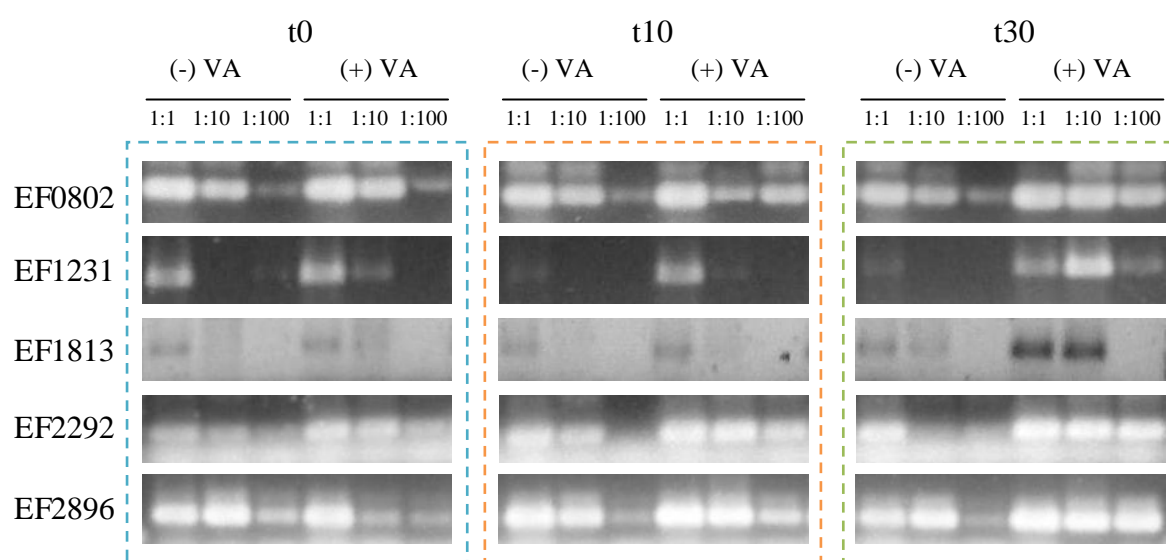


Figura 3.1 - Análise por RT-PCR semi-quantitativo da expressão dos genes EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896. Na figura pode observar-se os produtos obtidos por RT-PCR do RNA extraído a partir de *E. faecalis* V583 Δ ABC nos tempos t0, t10 e t30, na ausência e na presença de vancomicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). (-) VA - produtos do PCR na ausência de vancomicina; (+) VA - produtos de PCR na presença de vancomicina.

3.2 Construção de mutantes

3.2.1 Mutantes por deleção

3.2.1.1 Amplificação dos fragmentos I, II e II

Pela análise dos produtos amplificados nos PCR I e II, correspondentes aos fragmentos I e II das regiões a montante e a jusante dos genes onde se pretende efectuar a deleção (EF1231, EF1813 e EF2292), observou-se uma banda para cada fragmento de DNA com aproximadamente 1 Kb, que corresponde aproximadamente ao tamanho pretendido. Na Figura 3.2 pode observar-se um exemplo dos produtos de PCR obtidos para os genes EF1231 e EF1813.

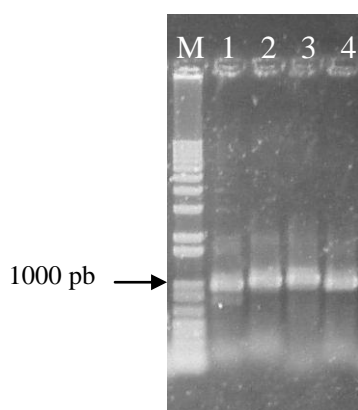


Figura 3.2 - Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos da amplificação dos PCR I e II dos genes EF1231 e EF1813. 1 – EF1231 PCR I; 2 – EF1231 PCR II; 3 – EF1813 PCR I; 4 – EF1813 PCR II e M – Marcador de massa molecular 1 Kb.

As moléculas de DNA obtidas a partir dos PCR I e II foram utilizadas no PCR III para obtenção do fragmento III. Nas reacções de amplificação dos fragmentos Δ EF1231 e Δ EF2292 não foram encontradas dificuldades, tendo-se obtido os respectivos fragmentos III. Na Figura 3.3, apresenta-se um exemplo dos resultados do PCR III para o EF1231, onde se observa uma banda com aproximadamente 2,1 Kb, que corresponde ao tamanho esperado do fragmento.

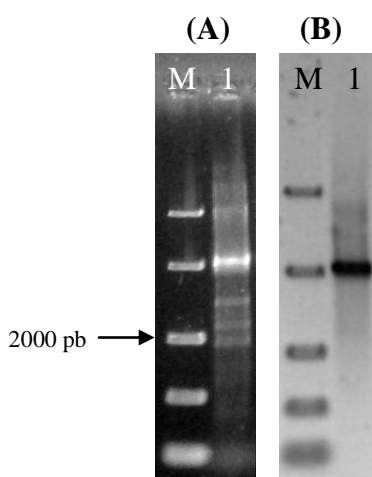


Figura 3.3 - Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos da amplificação (A) e purificação (B) do PCR III para obtenção do Δ EF1231. **1A** e **1B**- Fragmento Δ EF1231 com cerca de 2,1 Kb; **M** – Marcador de peso molecular *FastRuler*TM.

Relativamente ao fragmento Δ EF1813, encontraram-se algumas dificuldades que impediram a obtenção da molécula de DNA. Quando se analisaram os produtos do PCR III por electroforese em gel de agarose, verificou-se que os fragmentos obtidos não tinham o tamanho previsto. Por um lado, quando se utilizou a *taq* DNA polimerase *Easy-A® High Fidelity* observou-se um arrastamento ao longo do gel (Figura 3.4A). Por outro lado, quando se usou a enzima *Expand High Fidelity^{PLUS}*, as bandas de maior intensidade correspondiam aos fragmentos I e II (Figura 3.4B). Na tentativa de otimizar a reacção de amplificação do fragmento Δ EF1813, fizeram-se várias alterações às condições da reacção de PCR. Variou-se a quantidade de DNA dos fragmentos I e II, o tempo e temperatura de desnaturação inicial, o tempo e a temperatura de emparelhamento, o tempo de extensão, o número de ciclos e a quantidade de *taq* DNA polimerase. Apesar das inúmeras tentativas e alterações às condições de PCR não foi possível obter o fragmento, uma vez que os resultados obtidos foram sempre semelhantes aos exemplificados na Figura 3.4. Como tal, a construção do mutante o EF1813 encontra-se na fase de obtenção do fragmento III.

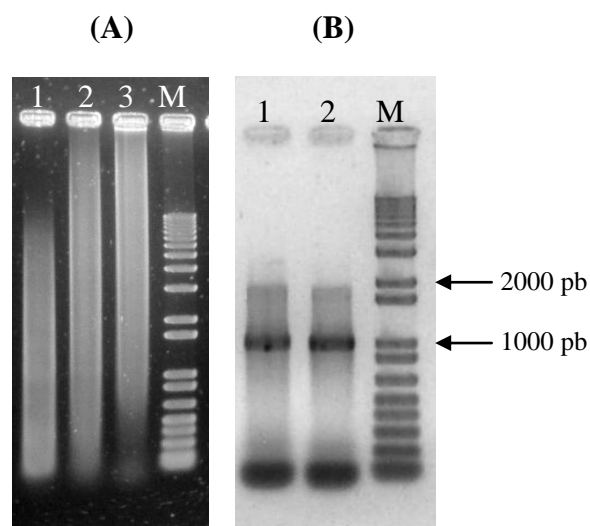


Figura 3.4 - Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos do PCR III do fragmento Δ EF813 com a enzima *Easy-A* (A) e *High Fidelity* (B). (A) PCR III onde se variou o tempo de extensão. 1 – 30 s, 2 – 90 s e 3 – 2 min 30 s. (B) PCR III com quantidades diferentes de DNA molde. As bandas com cerca de 1 Kb correspondem aos fragmentos I e II e as bandas ténues com aproximadamente 2 Kb correspondem ao tamanho esperado para o fragmento III; 1- 100 ng de fragmento I e fragmento II, 2- 30 ng de cada fragmento; M - Marcador de peso molecular 1 Kb.

3.2.1.2 Clonagem dos produtos de PCR nos vetores pGEM®-T e pG+host9

Os fragmentos de DNA recombinante com aproximadamente 2 Kb e que resultaram do PCR III com os *primers* externos 1 e 4 (Tabela 2.3, Capítulo 2), foram clonados no vector plasmídico pGEM®-T. Foi realizado um *screening* por PCR das colónias transformantes que aparentavam ter uma cor branca e em paralelo as colónias foram repicadas para novo meio de cultura. Pela análise da Figura 3.5, pode observar-se que a maioria dos fragmentos obtidos corresponde ao tamanho do produto esperado para o vector sem inserto, aproximadamente 300 pb. As colónias correspondentes acabaram por se revelar azuladas, confirmando a ausência do fragmento. Foram realizadas várias transformações para se obterem clones recombinantes com o fragmento do tamanho esperado. Por PCR de colónia confirmou-se a presença de um produto com cerca de 2 Kb, próximo do tamanho pretendido. Estes resultados foram obtidos para os genes EF1231 e EF2292, para os quais se conseguiu inserir o fragmento III (Δ EF1231 e Δ EF2292) no vector pGEM®-T.

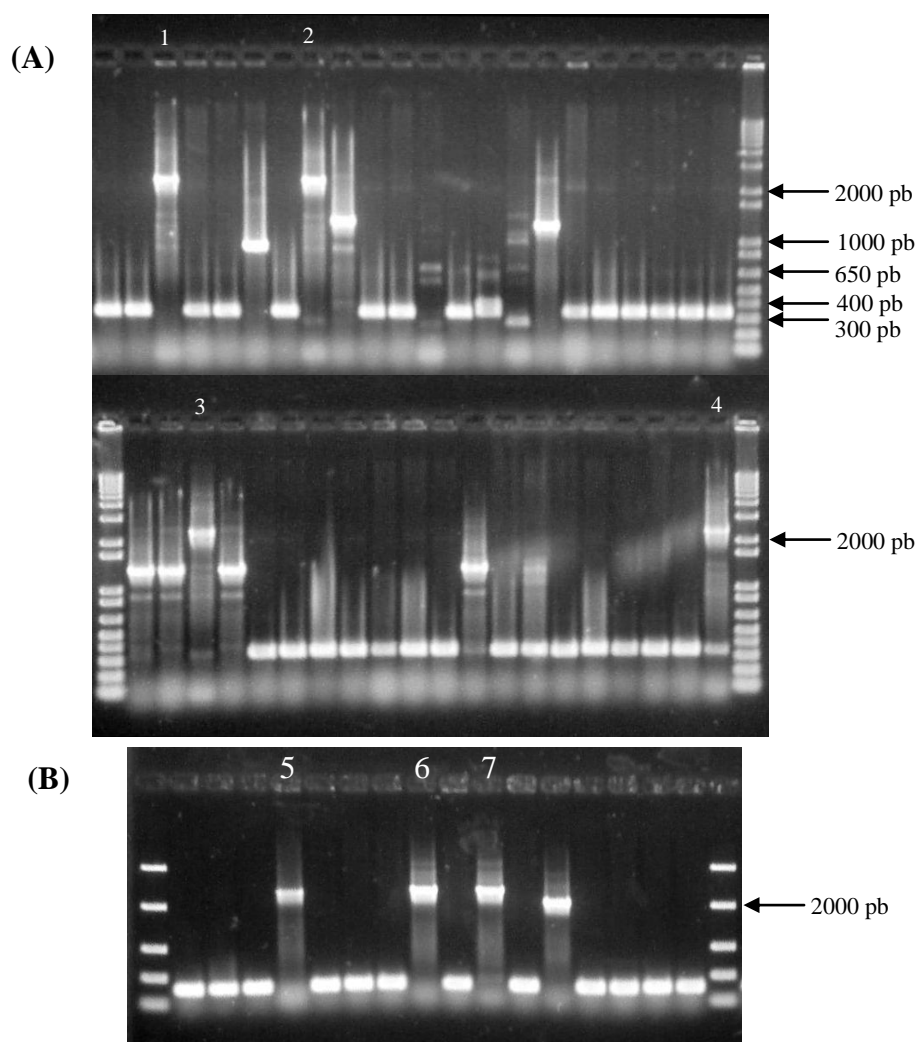


Figura 3.5 - Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos do PCR de colônias brancas de *E. coli* transformadas com as ligações ao plasmídeo pGEM®-T. (A) pGEM-T/ΔEF1231 e (B) pGEM-T/ΔEF2292. 1, 2, 3 e 4 – Possíveis clones recombinantes pGEM-T/ΔEF1231 e 5, 6 e 7 – Possíveis clones recombinantes pGEM-T/ΔEF2292.

Após a análise dos produtos dos PCR de colônia, os plasmídeos recombinantes foram sequenciados para garantir que a sequência dos fragmentos clonados era a prevista. A sequenciação dos clones recombinantes ΔEF2292 e ΔEF1231 mostrou que se tratavam dos fragmentos pretendidos, contudo ambos apresentavam mutações. Foi portanto necessário realizar novos PCR I, II e III na tentativa de obter novos fragmentos sem mutações. Uma vez clonados no pGEM®-T sequenciou-se um dos clones recombinantes do ΔEF2292 e verificou-se que a sequência era a pretendida, não continha nenhuma mutação e estava inserida na

orientação 3'→5' relativamente ao *primer* M13fwd (*primer* universal). Quanto ao fragmento Δ EF1231, foi sequenciado após duas clonagens, porém sempre com alterações na sua sequência. Assim, a construção do mutante EF1231, encontra-se na fase de amplificação dos fragmentos I e II.

Uma vez confirmada a integridade da sequência do fragmento Δ EF2292, removeu-se o fragmento do pGEM®-T com as enzimas de restrição SalI e SacII, clonou-se no pG+host9 e transformou-se em *E. coli* VE14188. Após verificação dos transformantes por PCR de colónia com os *primers* Ori1 e 1224dd (Tabela 2.5, Capítulo 2), purificou-se o plasmídeo recombinante pG+host9/ Δ EF2292 e introduziu-se em *E. faecalis* V583 Δ ABC. A identificação dos transformantes foi realizada da mesma forma que para *E. coli*, usando os *primers* específicos para o vector.

3.2.1.3 Selecção dos clones integrantes (SCO)

Após a alteração de temperatura, de 27 °C para 42 °C, que favoreceu a integração do plasmídeo, a selecção das colónias com o plasmídeo integrado no cromossoma foi realizada a 42 °C em meio com eritromicina. A identificação dos clones integrantes foi realizada por PCR de colónia com os *primers* EF2292_5 e EF2292_6. Os produtos dos PCR foram analisados por migração em gel de agarose (Figura 3.6). Pela análise da Figura 3.6 podem observar-se fragmentos com dois tamanhos moleculares diferentes, um com 1651 pb e outro com cerca de 1363 pb, que correspondem aos dois tipos de integração possíveis, tipo I e tipo II, respectivamente (Figura 3.8).

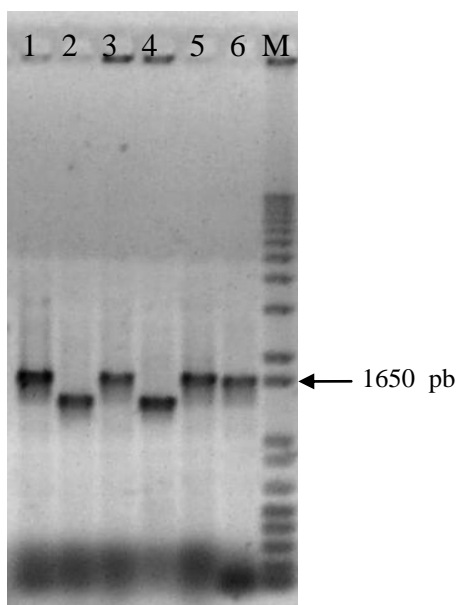


Figura 3.6 – Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos do PCR de colónia resultantes dos possíveis clones com o plasmídeo recombinantes pG+host9/ Δ EF2292 integrado no cromossoma. **1, 3 e 5** – Integração do tipo I; **2 e 4** – Integração do tipo II; **6** – Controlo com DNA do V583 Δ ABC; **M** – Marcador de peso molecular 1 Kb.

3.2.1.4 Selecção dos clones com deleção (DCO)

A excisão do plasmídeo foi promovida a 27 °C em meio sem antibiótico, através de várias passagens de meio. Em seguida, plaquearam-se várias diluições em meio sem antibiótico e incubou-se a 42 °C. Observando-se o crescimento bacteriano nas placas, verificou-se que o número de colónias nas placas sem antibiótico era consideravelmente superior ao número de colónias nas placas com antibiótico. Este facto poderá ser um bom indicador da excisão do plasmídeo, uma vez que a maioria das colónias perdeu a resistência à eritromicina e consequentemente o plasmídeo. Após identificação das colónias sensíveis à eritromicina, realizou-se PCR de colónia com os *primers* EF2292_5 e EF2292_6 para identificar os possíveis clones com deleção no gene. Pela análise dos produtos de PCR, pôde verificar-se que a maioria das colónias testadas por PCR tinha deleção no gene, pois observou-se uma banda com tamanho inferior (1363 pb) à banda obtida para a estirpe selvagem (1651 pb) (Figura 3.7).

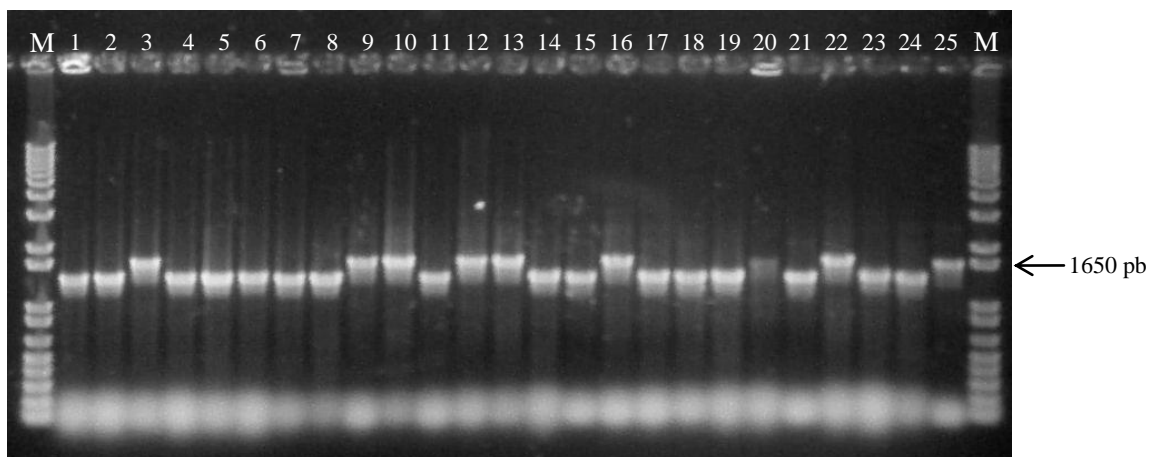


Figura 3.7 – Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR de colónia após a excisão do plasmídeo pG+host9. **1, 2, 4-8, 11, 14, 15, 17-19, 21, 23 e 24** – Clones com possível deleção; **3, 9, 10, 12, 13, 16, 20, 22** – Clones com o gene selvagem; **25** – Controlo com DNA de V583 ΔABC; **M** – Marcador de peso molecular 1 Kb.

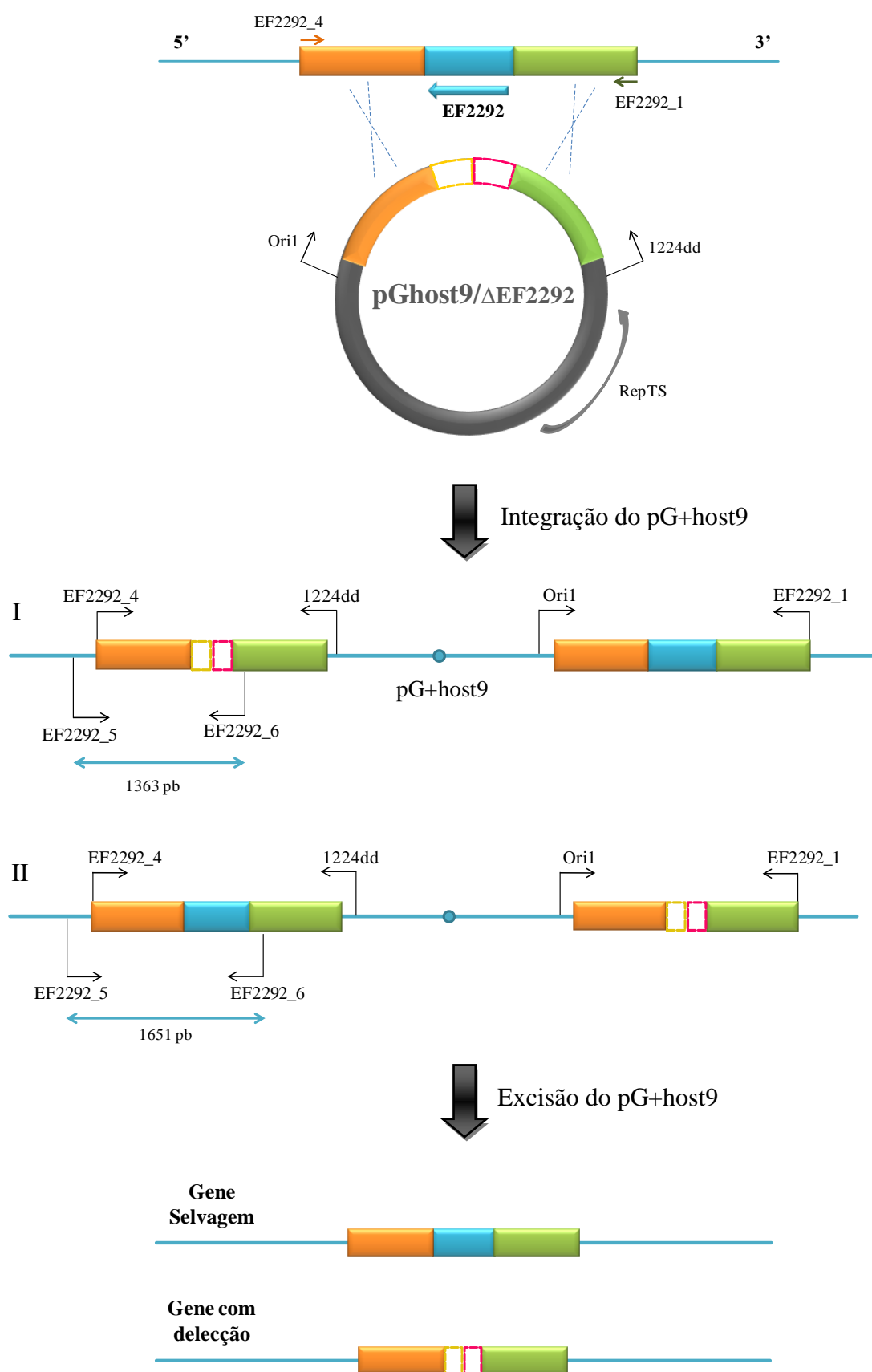


Figura 3.8 - Representação esquemática dos possíveis tipos de integração e excisão do pG+host9/ Δ EF2292 no genoma de V583 Δ ABC. Estão indicados, por setas, os sentidos dos *primers* específicos para o pG+host9 (Ori1 e 1224dd), dos *primers* do fragmento III (EF2292_1 e EF2292_4) e dos *primers* usados no *screening* da integração e da excisão do plasmídeo (EF2292_5 e EF2292_6).

3.2.2 Construção de mutantes por inserção de uma cassette de resistência

3.2.2.1 Amplificação dos fragmentos internos EF0802 e EF2896

Pela análise dos produtos de amplificação dos fragmentos internos, após migração em gel de agarose, observou-se uma banda com tamanho próximo do esperado para o fragmento EF0802 (261 pb) e uma banda com cerca de 200 pb, que se aproxima do tamanho pretendido para o fragmento EF2896 (191 pb) (Figura 3.9).

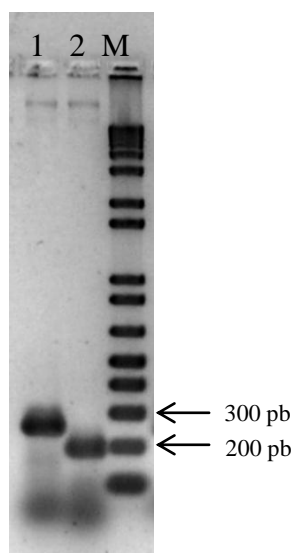


Figura 3.9 - Electroforese em gel de agarose 2 % dos produtos de amplificação dos fragmentos internos dos genes EF0802 e EF2896. **1** – Fragmento interno do EF0802 com cerca de 261 pb; **2** – Fragmento interno do EF2896 com aproximadamente 191 pb; **M** – Marcador de peso molecular 1 Kb.

3.2.2.2 Clonagem dos produtos de PCR no vector pVE14218

As moléculas de DNA que contêm as regiões internas dos genes EF0802 e EF2896, foram clonadas no vector pVE14218. Os clones recombinantes foram identificados pela análise da migração em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia (Figura 3.10). Pela análise da Figura 3.10, podem observar-se fragmentos com tamanho entre 500 pb e 600 pb,

que correspondem ao tamanho do produto esperado para o vector com inserto, cerca de 571 pb e 510 pb para o EF0802 e EF2896, respectivamente.

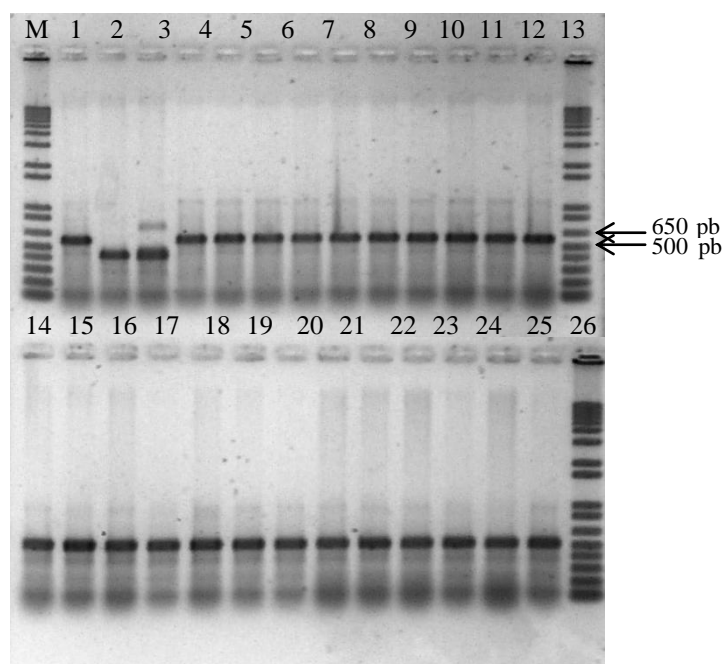


Figura 3.10 – Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR de colónia das transformações com pVE14218/EF0802 e pVE14218/EF2896. **1, 4-13** – Clones recombinantes EF0802; **2 e 3** – Vector sem inserto; **14-26** – Clones recombinantes EF2896; **M** – Marcador de peso molecular 1 Kb.

3.2.2.3 Selecção dos integrantes em *E. faecalis* V583 Δ ABC por choque térmico

Depois de confirmada a ligação dos fragmentos internos ao pVE14218, purificou-se o DNA plasmídico de um dos clones positivos e introduziu-se por electroporação na estirpe VE14412. Por PCR de colónia confirmou-se a presença dos plasmídeos recombinantes e posteriormente realizou-se o choque térmico para promover a integração do plasmídeo no cromossoma bacteriano. A selecção dos clones integrantes foi realizada na presença de tetraciclina e a 42 °C, uma vez que as colónias que crescerem a esta temperatura deverão ter o plasmídeo integrado, pois este é incapaz de se replicar. Das placas em que cresceram colónias resistentes, escolheram-se cinco colónias que foram utilizadas para realizar o *Southern blotting* para confirmar se eram mutantes para cada um dos genes de interesse. Na

Figura 3.11 estão representados os tipos possíveis de integração do plasmídeo pVE14218.

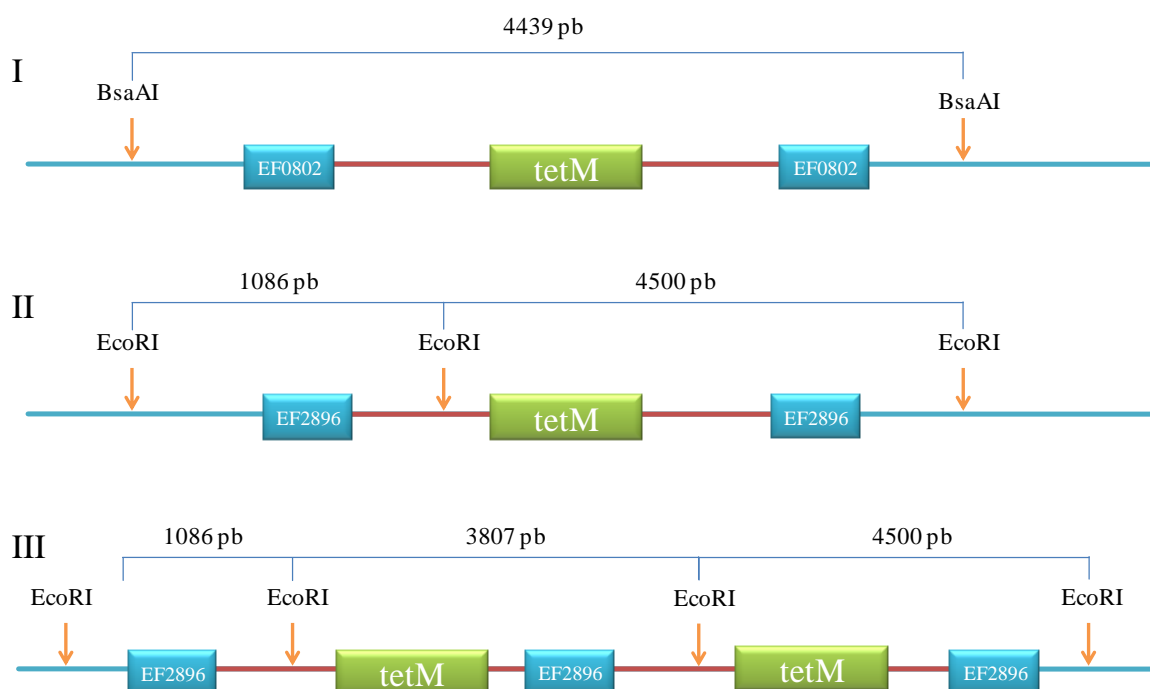


Figura 3.11 – Representação esquemática da inativação dos genes *EF0802* (I) e *EF2896* (II e III) por inserção do plasmídeo pVE14218 que tem uma cassete de resistência à tetraciclina. I – Digestão do DNA cromossômico com BsaAI origina um fragmento de 4439 pb (inserção de uma cópia do plasmídeo pVE14218 com 3657 pb); II – Digestão com EcoRI origina dois fragmentos, de 1086 pb e 4500 pb (inserção de uma cópia do plasmídeo); III – Digestão com EcoRI origina três fragmentos de 1086 pb, 3807 pb e 4500 pb (inserção de duas cópias do plasmídeo).

3.2.3 Confirmação dos mutantes por *Southern blotting*

3.2.3.1 Confirmação da deleção no gene *EF2292*

Para confirmar o mutante Δ EF2292 foram realizadas duas digestões enzimáticas independentes do DNA dos clones seleccionados. A digestão I foi efectuada com as enzimas de restrição BmtI, BsrGI e NcoI e a digestão II com as enzimas NsiI e Bpu10I (Capítulo 2, Figura 2.3).

Analisando os resultados obtidos para a digestão I (Figura 3.12A), pôde verificar-se, para os cinco clones Δ EF2292 testados, que as bandas observadas correspondem ao tamanho

esperado (3695 pb) para o gene mutante, uma vez que perdeu o local de restrição para a enzima BsrGI. Como se pode verificar, a estirpe selvagem apresenta 2 bandas, com tamanhos próximos dos previstos, 2331 pb e 1652 pb. Na digestão II (Figura 3.12B), mais uma vez se confirma a mutação no gene EF2292, pois as bandas correspondentes ao Δ EF2292 são inferiores à banda da estirpe selvagem, ou seja, a banda esperada para os mutantes tem 4897 pb e para o V583 Δ ABC é de 5185 pb.

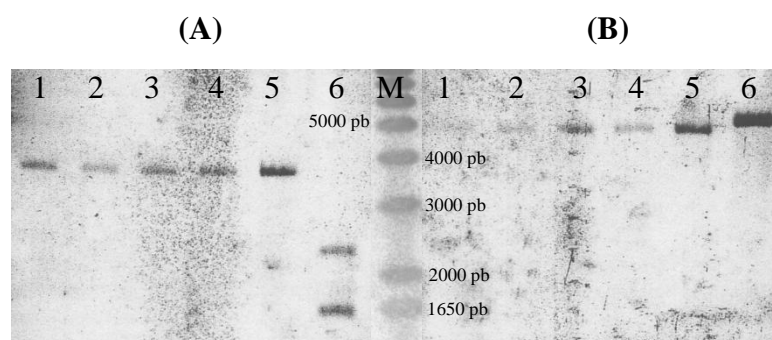


Figura 3.12 - Membrana resultante do *Southern blotting* para confirmação dos mutantes Δ EF2292. (A) Digestão I, com as enzimas de restrição BmtI, BsrGI e NcoI. (B) Digestão II, com as enzimas NsiI e Bpu10I. 1 - Δ EF2292#5; 2 - Δ EF2292#14; 3 - Δ EF2292#17; 4 - Δ EF2292#21; 5 - Δ EF2292#23; 6 - V583 Δ ABC; M - marcador de peso molecular 1 Kb.

3.2.3.2 Confirmação da inserção da cassete de resistência à tetraciclina nos genes EF0802 e EF2896

Visualizando os resultados para confirmação dos mutantes por inserção de cassete de resistência à tetraciclina nos genes EF0802 e EF2896, verificou-se que as bandas obtidas não correspondiam ao tamanho esperado para os fragmentos com plasmídeo pVE14218 inserido. Para o EF0802 obtiveram-se fragmentos superiores à banda de 12 Kb do marcador de peso molecular (Figura 3.13A), o que não permite identificar o tamanho aproximado. No entanto, é pouco provável que o plasmídeo esteja inserido no gene EF0802, uma vez que o tamanho esperado para a inserção de uma cópia do plasmídeo é de 4439 pb (

Figura 3.11-I).

No caso do EF2896 visualizam-se bandas de vários tamanhos (Figura 3.13B), contudo nenhuma corresponde ao esperado, tanto para uma inserção simples, como para a inserção

dupla do plasmídeo. Pois, a inserção de uma cópia do plasmídeo resultaria em duas bandas, uma de 4500 pb e outra de 1086 pb (

Figura 3.11-II), o que não se verificou. A inserção de duas cópias originaria o aparecimento de 3 bandas de 4500 pb, 3807 pb e 1086 pb (

Figura 3.11-III).

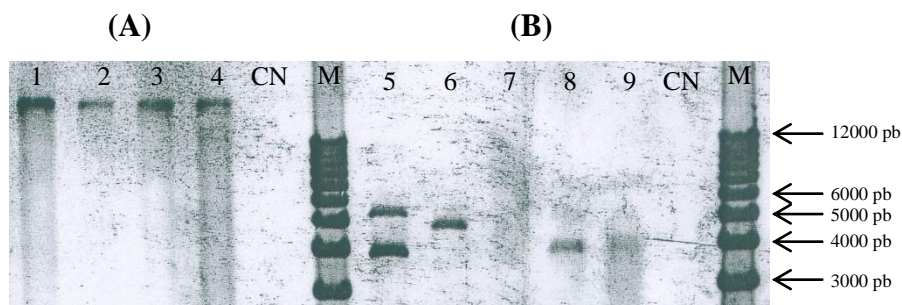


Figura 3.13 – Membrana resultante do *Southern blotting* para confirmação dos mutantes por inserção EF0802 (A) e EF2896 (B), hibridada com o plasmídeo pVE14218 marcado com digoxigenina.

(A) Digestão do DNA cromossômico dos clones integrantes EF0802 com a enzima BsaAI. (B) Digestão DNA dos clones integrantes EF2896 com a enzima EcoRI. CN - Controlo negativo com V583 Δ ABC; M – marcador de peso molecular 1 Kb.

3.3 Teste de susceptibilidade a antibióticos

O EF2292 está localizado a jusante do gene *vanX_B* do operão *vanB* e, no estudo de transcriptômica apresentou os mesmos níveis de expressão que os restantes genes do operão. Deste modo, realizaram-se estudos por *Northern blotting* e RT-PCR que verificaram que o EF2292 é co-transcrito com os genes do operão *vanB*. Como tal, testou-se a resistência do mutante EF2292 face à vancomicina pelo método Etest® e obteve-se uma CIM ≥ 256 mg.mL⁻¹, que é igual à CIM da estirpe *wild-type* V583 Δ ABC. Ou seja, o mutante não apresentou alteração de fenótipo relativamente à resistência à vancomicina.

Pela análise dos resultados obtidos para os antibióticos testados (Tabela 3.1), segundo as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), verificou-se que para cada um dos 5 clones Δ EF2292 a susceptibilidade / resistência mantém-se relativamente à estirpe selvagem V583 Δ ABC, não havendo alteração de fenótipo. Na Tabela 3.1, encontram-se os

resultados dos testes de susceptibilidade para o V583 Δ ABC e para o mutante EF2292#23. Os resultados obtidos para os clones Δ EF2292#5, Δ EF2292#14, EF2292#17 e Δ EF2292#21, não são apresentados, pois foram iguais.

Tabela 3.1 – Tabela com os resultados dos testes de susceptibilidade para o mutante Δ EF2292#23 e para a estirpe selvagem.

Antibiótico	V583 Δ ABC	V583 Δ ABC Δ EF2292#23
Ampicilina	R	R
Bacitracina	R	R
Cefoperazona	R	R
Ciprofloxacina	S	S
Cloranfenicol	S	S
Eritromicina	I	I
Gentamicina	R	R
Imiperem	S	S
Lincomicina	R	R
Meticilina	R	R
Penicilina G	S	S
Sulfametoxazol/Trimetoprim	S	S
Tetraciclina	S	S
Vancomicina	R	R

R - Resistente

S - Sensível

I – Intermédio

3.4 Curvas de Crescimento

Para verificar se a deleção no gene EF2292 altera o crescimento da estirpe mutante relativamente à estirpe selvagem, realizaram-se curvas de crescimento de 3 clones mutantes EF2292 (#5, #14 e #17) e do V583 Δ ABC. Pela análise das curvas de crescimento (Figura 3.14), pode constatar-se que os 3 clones mutantes estudados crescem mais lentamente em meio BHI que o V583 Δ ABC, iniciando a fase exponencial cerca de 50 min depois da estirpe selvagem. No entanto, a DO final é semelhante para os quatro microrganismos.

Depois da adição da vancomicina (DO_{600nm} entre 0,30 e 0,35) o crescimento de todos os microrganismos abrandou, não ultrapassando, a maioria, a densidade óptica de 0,60. Pode constatar-se ainda, que nos 30 min seguintes à adição de vancomicina as culturas que foram induzidas cresceram mais rapidamente do que as culturas que não sofreram *stress*. Ainda assim, o crescimento dos mutantes na presença de vancomicina não parece ser afectado quando comparado com a estirpe V583 ΔABC , apresentando um comportamento semelhante.

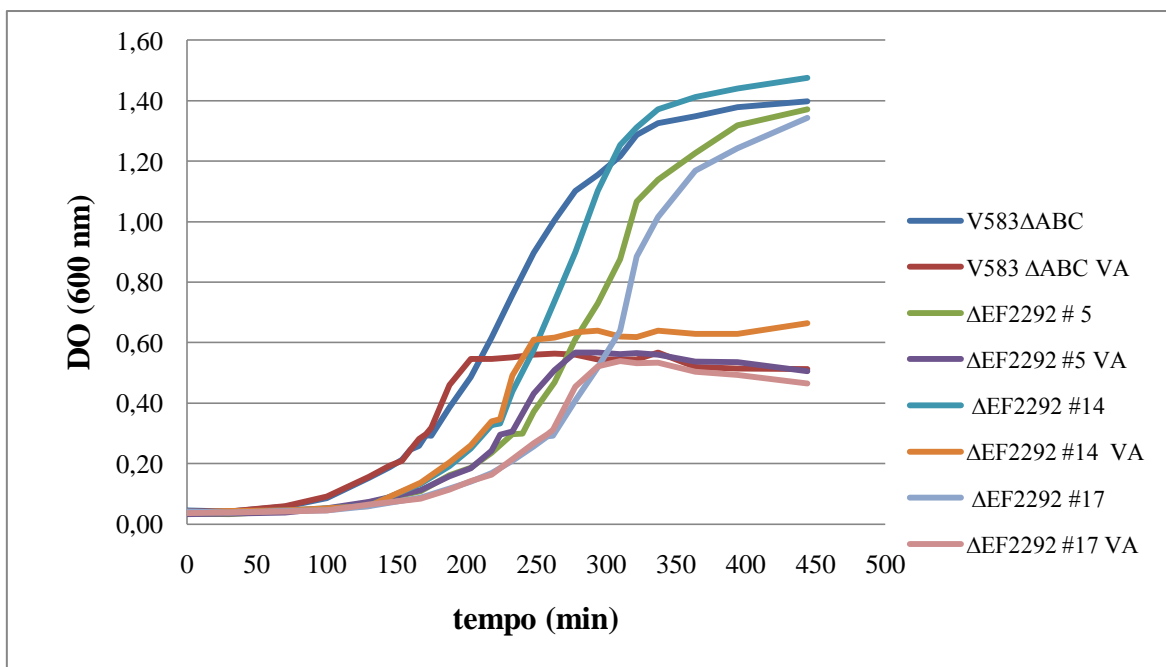


Figura 3.14 - Curva de crescimento dos clones mutantes $\Delta EF2292$ (#5, #14 e #17) e da estirpe selvagem *E. faecalis* V583 ΔABC na ausência de vancomicina e após a adição de $10 \mu g.mL^{-1}$ de vancomicina entre 0,30 e 0,35 de DO a 600 nm.

3.5 Expressão heteróloga das proteínas EF1231 e EF2292

3.5.1 Análise de sequências

Pela análise das sequências nucleotídicas da região a montante dos genes EF1231 e EF2292, verificou-se a ausência de uma sequência característica de um RBS.

A análise da sequência de aminoácidos da proteína hipotética EF1231, utilizando as ferramentas SOSUI e TMHMM, revelou a existência de um domínio transmembranar (Figura 3.15), característico de uma proteína de membrana. Por outro lado, a análise com a ferramenta SignalP revelou a existência de uma possível sequência sinal, e como tal a proteína hipotética EF1231 poderá ser uma proteína que é secretada.

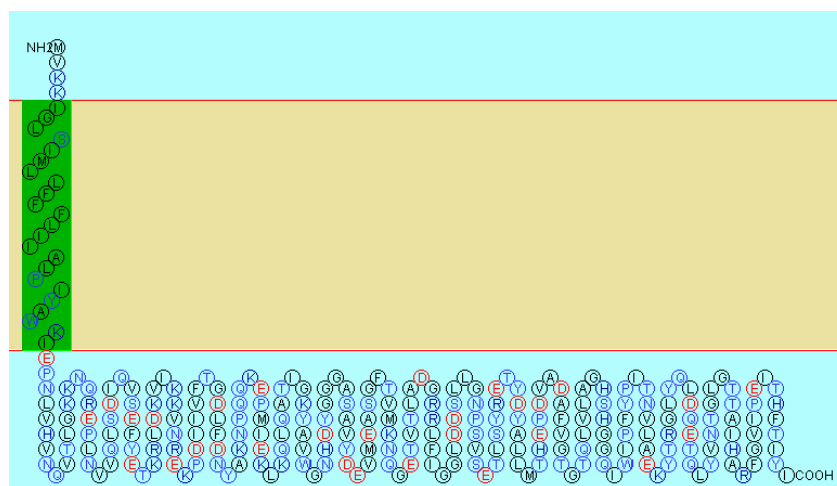


Figura 3.15 - Estrutura da proteína hipotética EF1231 obtida pela análise da sequência de aminoácidos com o programa SOSUI, onde se observa a existência de uma hélice transmembranar, que corresponde à sequência sinal.

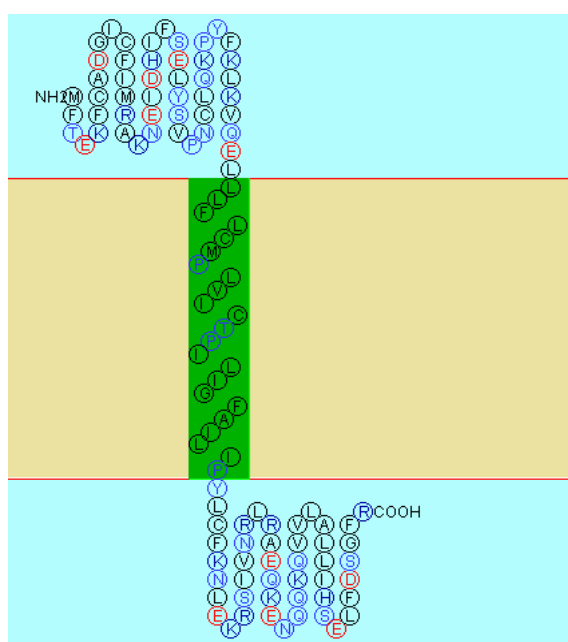


Figura 3.16 – Estrutura da proteína hipotética EF2292 obtida pela análise da sequência de aminoácidos com o programa SOSUI, onde se observa a existência de uma hélice transmembranar.

A análise das sequências EF1231 e EF2292, com a ferramenta GCUA, revelou a existência de alguns códons cujos tRNAs são pouco abundantes em *E. coli*. A sequência de aminoácidos de EF1231 contém os códons ATA, GGA, AGA e CTA e a sequência EF2292 contém os códons CCC e GGA. Apesar de os seus tRNA destes códons serem pouco abundantes em *E. coli* poderão não afectar a expressão das proteínas, pois não existem em número elevado.

Optou-se por escolher para a expressão das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292, várias estirpes de *E. coli* (BL21, C41, C43 e *Rosetta* 2) com características diferentes, de forma a verificar qual a mais adequada para a produção de cada uma das proteínas. Todas as estirpes produzem a T7 RNA polimerase, necessária para a transcrição dos genes clonados no pET-15b, cuja transcrição encontra-se dependente do promotor T7. A estirpe BL21 foi escolhida porque é uma das mais utilizadas para a expressão heteróloga de proteínas. As estirpes C41 e C43 foram escolhidas, pois toleram melhor a expressão de proteínas de membrana e proteínas tóxicas. A estirpe *Rosetta* 2 contém um plasmídeo, pRARE2, que fornece o tRNA para 7 códons (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA e CGG), pois estes são pouco abundantes em *E. coli*, o que pode aumentar a expressão de proteínas que contenham alguns destes códons.

3.5.2 Amplificação e Clonagem dos produtos de PCR no vector pET-15b

Após análise dos produtos de PCR, verificou-se a amplificação de um produto com cerca de 850 pb e um com cerca de 400 pb (Figura 3.17), que corresponderem ao EF1231 (825 pb) e ao EF2292 (345 pb), respectivamente.

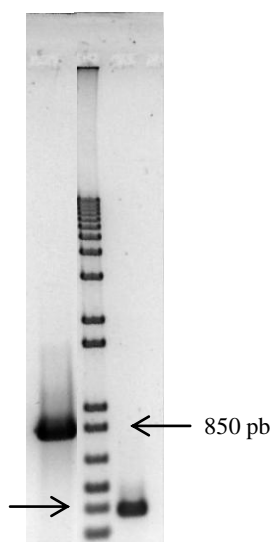


Figura 3.17 - Electroforese em gel de agarose 1 % dos produtos de amplificação dos genes EF1231 e EF2292. 1 – Fragmento próximo de 825 pb correspondente ao EF1231; 2 – Fragmento do EF2292 com aproximadamente 345 pb.

400 pb

Os produtos da amplificação por PCR foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e BamHI e inseridos no vector de expressão pET-15b, destinado à clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. O *screening* dos transformantes foi realizado por PCR de colônia, como descrito anteriormente. Analisando os resultados de PCR para o EF1231 e EF2292 observou-se uma banda com cerca de 1008 pb (Figura 3.18 - 3A) e 533 pb (Figura 3.18 - 1B e 5B), respectivamente, que corresponde ao tamanho do produto do vector com inserto, a partir do local de hibridação dos *primers* usados.

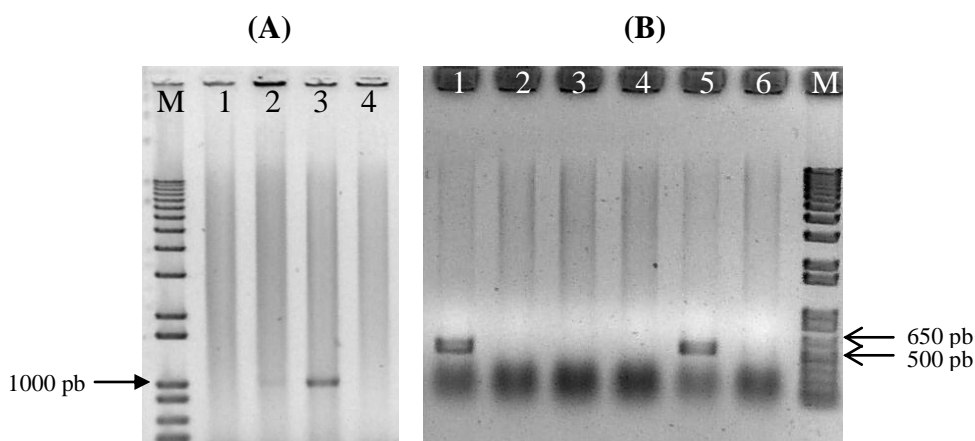


Figura 3.18 – Géis de agarose dos produtos do *screening* por PCR de colônia dos transformantes pET/EF1231 (A) e pET/EF2292 (B). **3A** – clone recombinante EF1231, com aproximadamente 1008 pb. **1B** e **5B** – clones recombinantes EF2292, com cerca de 533 pb. **M** – Marcador de peso molecular 1 kb.

Os resultados de sequenciação mostraram que as sequências clonadas não continham mutações. Deste modo, os plasmídeos recombinantes pET/EF1231 e pET/EF2292 foram purificados e introduzidos nas estirpes *E. coli* C41 (DE3), *E. coli* C43 (DE3) e *E. coli* Rosetta 2 (DE3), para sobre-expressão das proteínas, como descrito anteriormente.

3.5.3 SDS-PAGE

A expressão das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292 foi confirmada após a separação por SDS-PAGE das proteínas totais de cada cultura induzida, fixação do gel e imunodeteção das caudas de histidinas presentes no N-terminal das proteínas expressadas, utilizando o reagente *InVision™ His-tag In-gel Stain*.

Observando os resultados do gel onde se efectuou a imunodeteção das caudas de histidinas (Figura 3.19B) e comparando, posteriormente, com o gel corado com azul de *coomassie* (Figura 3.19A), verifica-se que houve sobre-expressão das proteínas EF1231 (27,4 kDa) e EF2292 (11,4 kDa), contudo a proteína EF1231 exibe uma menor expressão relativamente à proteína EF2292. A proteína EF2292 parece ter sido expressa em maior quantidade nas estirpes C41 e C43 e a proteína EF1231 na estirpe *Rosetta 2*. A estirpe BL21 não transformada e não induzida com IPTG foi utilizada como controlo da expressão uma vez que as outras estirpes usadas derivaram desta estirpe.

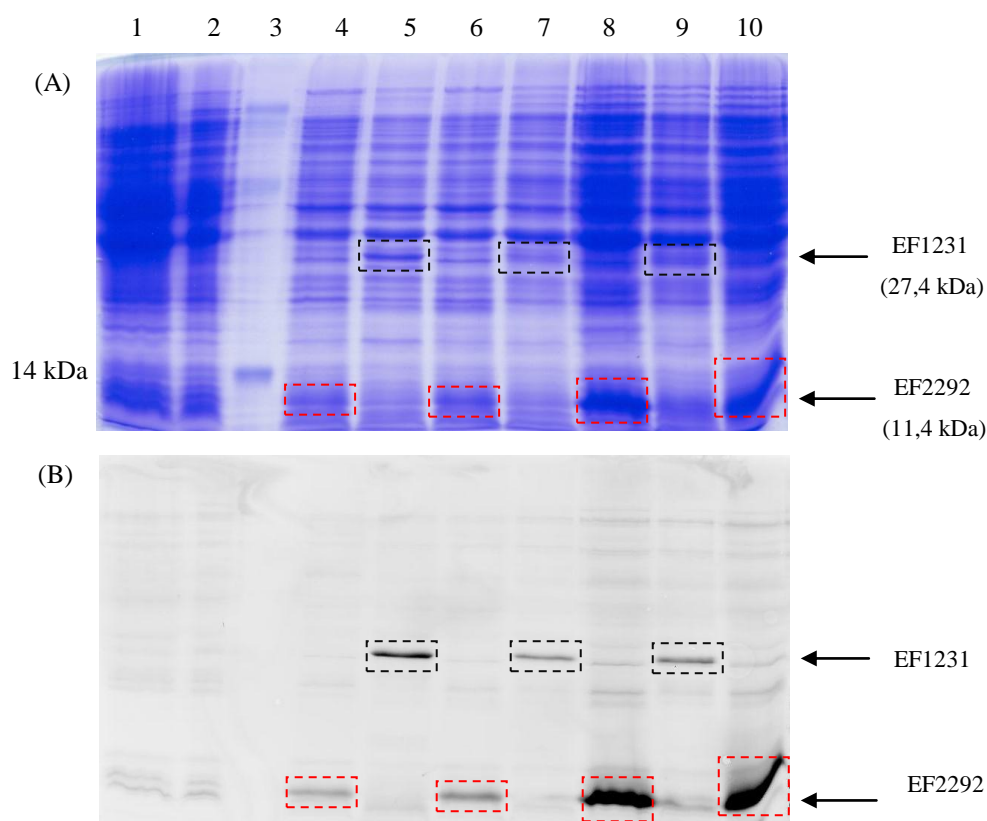


Figura 3.19 – Expressão das proteínas hipotéticas EF1231 e EF2292 de *Enterococcus faecalis* V583 em *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Rosetta 2 (DE3), *E. coli* C41 (DE3), *E. coli* C43 (DE3). (A) SDS-PAGE e visualização após coloração com azul de *coomassie*. (B) Detecção das caudas de histidinas

no N-terminal de cada proteína através imunodeteção com o reagente *InVision™ His-tag In-gel Stain*. As bandas mais tênues e que não estão assinaladas correspondem a hibridações inespecíficas. 1 - Controlo com BL21; 2 - BL21/EF1231; 3 - Marcador de massa molecular; 4 - BL21/EF2292; 5 - Rosetta2/EF1231; 6 - Rosetta2/EF2292; 7 - C41/EF1231; 8 - C41/2292; 9 - C43/1231; 10 - C43/2292.

4. Discussão

Na sequência de um estudo de transcriptômica, para avaliar a resposta da estirpe *E. faecalis* V583 a uma dose terapêutica de vancomicina, verificou-se uma expressão diferencial de muitos genes, a maioria codificando para proteínas de função desconhecida e/ou proteínas hipotéticas. Estudos semelhantes, com a mesma estirpe, mas nas quais se estudou a resposta a sais biliares (Flahaut *et al.*, 1996, Solheim *et al.*, 2007) e à eritromicina (Aakra *et al.*, 2005), encontrou-se também uma percentagem elevada de genes de proteínas hipotéticas diferencialmente transcritos. Em conjunto, estes resultados sugerem que as proteínas hipotéticas podem desempenhar um papel importante na resposta desta bactéria a diferentes tipos de *stresses*.

A escolha dos genes EF0802, EF1231, EF1813, EF2292 e EF2896, baseou-se no facto de apresentarem uma expressão mais elevada relativamente àquela observada na ausência de vancomicina. O EF2292, para o qual foi dada maior importância durante o trabalho, foi também escolhido uma vez que está localizado a jusante do gene *vanX_B* do operão *vanB* e, porque na análise transcriptômica efectuada anteriormente, apresentou o mesmo nível de expressão que os restantes genes do operão. Por *Northern blotting* e por RT-PCR também foi verificado que o EF2292 é co-transcrito com os genes do operão *vanB* (resultados não publicados). Estes resultados suscitaram interesse, pois este gene poderá estar envolvido no mecanismo de resistência ou na resposta à vancomicina.

Este trabalho iniciou-se pela verificação dos resultados obtidos anteriormente, recorrendo à análise semi-quantitativa por RT-PCR. A análise efectuada confirmou a elevada expressão dos genes referidos anteriormente, após a introdução de um *stress* com vancomicina.

Comparando os resultados obtidos para as células sujeitas ao *stress* com os obtidos com as células não sujeitas ao *stress*, observou-se que todos os genes estudados apresentam um nível elevado de mRNA no tempo t30, e que aumenta ao longo do tempo (t0→t10→t30). Observou-se, ainda, que todos os genes estudados apresentam uma expressão basal, estando também expressos nas células que não sofreram nenhum estímulo desde o início da fase exponencial. Estes genes não são apenas expressos em condições de *stress*, e como tal, não se pode descartar a hipótese de desempenharem outras funções na célula, para além das inerentes à resposta à vancomicina. Assim, a resposta observada na presença de vancomicina pode estar relacionada com o *stress* imposto à célula e não ser específica para a vancomicina. Estes genes podem contribuir para a manutenção do crescimento durante a exposição ao antibiótico. Estes resultados são apenas a resposta à vancomicina em termos de variação da quantidade de

mRNA detectada face ao antibiótico. Será, extremamente importante, analisar se essas variações de quantidade de RNA se traduzem em variação da quantidade de proteína ou se tem outras funções, como por exemplo reguladoras, na célula.

O gene EF2292, co-transcrito com os genes do operão de resistência à vancomicina, VanB, e que apresenta um aumento da quantidade de RNA, na presença de *stress* com este antibiótico, pode apresentar uma função reguladora na célula.

Uma vez obtido o mutante EF2292, este foi estudado no sentido de encontrar um fenótipo que permita a colocação de uma hipótese quanto ao seu papel na célula. A deleção do gene EF2292 não provocou alteração de fenótipo para a vancomicina, nem para outros antibióticos testados, quando se comparou com a estirpe selvagem, não tendo fornecido informação suficiente que permitisse a formulação de uma hipótese de função para o produto deste gene. Por outro lado, tanto o V583 Δ ABC, como o Δ EF2292 são resistentes à vancomicina e sobrevivem em elevadas concentrações deste antibiótico, no entanto o seu crescimento é limitado na sua presença, como se verificou nas curvas de crescimento. Como tal, o crescimento do Δ EF2292 na presença de vancomicina, também forneceu informação que direccionasse para uma possível função. É também importante referir que a deleção deste gene provocou um atraso no crescimento na ausência de vancomicina. Este facto pode sugerir que o EF2292 tenha uma função independente da resistência a este antibiótico.

A ausência de uma sequência característica de um local de ligação ao ribossoma (RBS), na região a montante do codão de iniciação do gene EF2292, e a existência de codões de iniciação e de terminação pouco usuais, parecem sugerir, à partida, que este origina um RNA que não é traduzido em proteína. No entanto, não se pode eliminar a hipótese de este gene conter outros sinais, a montante ou mesmo na região codificante, que permitam a tradução do mRNA transcrito em proteína, apesar de aparentemente ausentes.

Assim, e na tentativa de atribuir uma função para o produto do gene EF2292, poderão ser adoptadas várias abordagens. Por um lado, e assumindo que este gene possa ser traduzido, realizou-se a sobre-expressão desta proteína hipotética em *E. coli*, para que a sua purificação e posterior obtenção de uma estrutura provável, forneça alguma informação relativamente a uma possível função celular. Por outro lado, poderá vir a ser utilizada uma fusão traducional que, através de um gene repórter inserido *in frame* entre o N-terminal e o C-terminal do gene que codifica a proteína hipotética EF2292, permita (ou não) a observação *in vivo* da proteína traduzida.

Não descartando a hipótese de desempenhar uma função reguladora na transcrição dos genes do operão, como por exemplo na terminação da transcrição do operão, será mapeada a extremidade 3' do transcrito de RNA do gene EF2292, na estirpe *wild-type* e no mutante. O objectivo será determinar o fim da transcrição e verificar se a deleção do gene afecta a terminação desta. Deste modo, podem obter-se mais informações que ajudem na atribuição de uma função para o produto deste gene. Este estudo será efectuado recorrendo à técnica de *Rapid Amplification of 3' cDNA ends* (3' RACE), segundo o protocolo descrito por (Argaman *et al.*, 2001). O mutante EF2292 será ainda analisado por RT-PCR semi-quantitativo, nas condições descritas anteriormente, pretendendo-se verificar se a deleção do gene EF2292 altera os níveis de expressão dos genes do operão *vanB*.

Nos últimos anos, devido à evolução de técnicas moleculares e bioquímicas, tem sido possível atribuir funções a proteínas e/ou genes até há pouco tempo anotados como proteínas hipotéticas ou de função desconhecida. Geralmente, o aumento do conhecimento decorre da construção de mutantes nesses genes e posterior expressão, purificação e caracterização das respectivas proteínas. Em *E. faecalis* a virulência e a capacidade de resistência a inúmeros *stresses* está ainda pouco esclarecida, e dado que em estudos de transcriptómica muitos dos genes cuja expressão é alterada codificam para proteínas hipotéticas, e tendo em conta sucessos noutras bactérias, é lícito assumir que um estudo direccionado às proteínas hipotéticas de *E. faecalis* possa ajudar a esclarecer muitos aspectos da sua infecciosidade e sucesso em vários ambientes. Assim, foi este o objectivo do presente trabalho.

Alguns dos genes escolhidos para este projecto são muito pequenos e os métodos de construção de mutantes, estabelecidos com sucesso para outros genes, tornaram-se difíceis de implementar. No entanto, um dos mutantes foi construído com sucesso, embora até ao momento, não tenha sido possível atribuir-lhe um fenótipo.

No que respeita à expressão das proteínas hipotéticas, EF1231 e EF2292, foi possível encontrar um sistema de expressão com sucesso. Assim será possível num futuro próximo, purificá-las e obter a sua estrutura, por NMR ou cristalografia, por exemplo. Também será possível, identificar uma possível localização celular destas proteínas, se no citoplasma, na membrana ou extracelular. É do conhecimento geral que a estrutura terciária de uma proteína pode ter tanto peso na sua função como a sua estrutura primária. Existem, de facto, enzimas que em diferentes organismos desempenham funções semelhantes, tem a mesma estrutura terciária, mas a sua sequência tem apenas uma percentagem mínima de semelhança. Determinar a estrutura terciária destas proteínas pode de facto elucidar a sua função.

5. Bibliografia

- Aakra, A., Vebo, H., Snipen, L., Hirt, H., Aastveit, A., Kapur, V., Dunny, G., Murray, B.E. e Nes, I.F. 2005. Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to erythromycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49: 2246-2259.
- Andrewes, F.W. e Horder, T.J. 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet* ii: 708-713.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E.G., Margalit, H. e Altuvia, S. 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Current Biology* 11: 941-950.
- Arthur, M. e Courvalin, P. 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 37: 1563-1571.
- Arthur, M., Reynolds, P. e Courvalin, P. 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology* 4: 401-407.
- Barna, J.C. e Williams, D.H. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annual Review of Microbiology* 38: 339-357.
- Boyd, D.A., Willey, B.M., Fawcett, D., Gillani, N. e Mulvey, M.R. 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 52: 2667-2672.
- Brinster, S., Furlan, S. e Serror, P. 2007. C-terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 189: 1244-1253.
- Cetinkaya, Y., Falk, P. e Mayhall, C.G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 686-707.
- Chavers, L.S., Moser, S.A., Benjamin, W.H., Banks, S.E., Steinhauer, J.R., Smith, A.M., Johnson, C.N., Funkhouser, E., Chavers, L.P., Stamm, A.M. e Waites, K.B. 2003. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *Journal of Hospital Infection* 53: 159-171.

- Chung, C.T., Niemela, S.L. e Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2172-2175.
- Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42: S25-34.
- Davies, J., Spiegelman, G.B. e Yim, G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion Microbiology* 9: 445-453.
- DeLisle, S. e Perl, T.M. 2003. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest* 123: 504S-518S.
- Depardieu, F., I., P., Leclercq, R., Collatz, E. e Courvalin, P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 79-114.
- Dower, W.J., Miller, J.F. e Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127-6145.
- Dunny, G.M., Lee, L.N. e LeBlanc, D.J. 1991. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1194-1201.
- Evers, S. e Courvalin, P. 1996. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of Bacteriology* 178: 1302-1309.
- Facklam, R.R., Carvalho, M.G. e Teixeira, L.M. 2002. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. *in The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance* (Gilmore, M.S. ed.), pp 1-54, ASM Press, Washington, DC.
- Fisher, K. e Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155: 1749-1757.
- Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P. e Auffray, Y. 1996. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2416-2420.
- Fouet, A. e Sonenshein, A.L. 1990. A target for carbon source-dependent negative regulation of the citB promoter of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 172: 835-844.

- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. e De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106: 1-24.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H. e Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47: 1-24.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. e Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88: 105-122.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 215-222.
- Giridhara Upadhyaya, P.M., Ravikumar, K.L. e Umapathy, B.L. 2009. Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27: 301-305.
- Gold, H.S. 2001. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. *Clinical Infections Diseases* 33: 210-219.
- Gold, O.G. e Moellering, R.C. 1996. Antimicrobial-drug resistance. *The New England Journal of Medicine* 335: 1445-1453.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. e Mitaku, S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378-379.
- Hugas, M., Garriga, M. e Aymerich, M.T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88: 223-233.
- Jett, B.D., Huycke, M.M. e Gilmore, M.S. 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 462-478.
- Kalina, A.P. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology* 20: 185-189.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. e Sonnhammer, E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305: 567-580.
- Lancefield, R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine* 57: 571-595.

- Lavigne, J.-P., Marchandin, H., Czarnecki, E., Kaye, C. e Sotto, a. 2005. Enterococcal bacteremia at Nîmes university hospital. *Pathologie Biologie* 53: 539-545.
- Lopes, M.F., Ribeiro, T., Abrantes, M., Marques, J.J., Tenreiro, R. e Crespo, M.T. 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology* 103: 191-198.
- Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S.D. e Gruss, A. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 178: 931-935.
- Marothi, Y.A., Agnihotri, H. e Dubey, D. 2005. Enterococcal resistance - an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology* 23: 214-219.
- Marshall, C.G., Lessard, I.A., Park, I. e Wright, G.D. 1998. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2215-2220.
- Méndez-Álvarez, S., Pérez-Hernández, X. e Claverie-Martín, F. 2000. Glycopeptide resistance in enterococci. *International Microbiology* 3: 71-80.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F. e Gilmore, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 513-522.
- Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 3: 46-65.
- Nicolaou, K.C., Boddy, C.N., Brase, S. e Winssinger, N. 1999. Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 38: 2096-2152.
- Ogier, J.C. e Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126: 291-301.
- Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. *Mémoires de l'Académie Royale des Sciences et des Lettres de Danemark, Section des Sciences* 8ième Série 5: 81-197.
- Paulsen, I.T., Banerjee, L., Myers, G.S., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., Tettelin, H., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune,

- D., Ketchum, K.A., Dougherty, B.A. e Fraser, C.M. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299: 2071-2074.
- Poh, C.H., Oh, H.M. e Tan, A.L. 2006. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *Journal of Infection* 52: 383-386.
- Pootoolal, J., Neu, J. e Wright, G.D. 2002. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42: 381-408.
- Ribeiro, T., Pinto, V., Gaspar, F. e Lopes, M.F. 2008. *Enterococcus hirae* causing wound infection in a hospital. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 3: 150-152.
- Schleifer, K.H. e Kilpper-Balz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 31-34.
- Serror, P., Sasaki, T., Ehrlich, S.D. e Maguin, E. 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 46-52.
- Sherman, J.M. 1937. The streptococci. *Bacteriological Reviews* 1: 3-97.
- Solheim, M., Aakra, A., Vebo, H., Snipen, L. e Nes, I.F. 2007. Transcriptional responses of *Enterococcus faecalis* V583 to bovine bile and sodium dodecyl sulfate. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5767-5774.
- Sood, S., Malhotra, M., Das, B.K. e Kapil, A. 2008. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *The Indian Journal of Medical Research* 128: 111-121.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S. e Shankar, N. 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 2622-2636.
- Thiercelin, M.E. 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *Comptes Rendus des Scéances de la Société de Biologie* 51: 269-271.
- Top, J., Willems, R. e Bonten, M. 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52: 297-308.
- Woodford, N. 1998. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. *Journal of Medical Microbiology* 47: 849-862.

6. Anexos

Tabela 6.1 – Estirpes e plasmídeos utilizados neste trabalho.

Estirpe ou Plasmídeos	Características Relevantes	Referência
Estirpes		
<i>E. faecalis</i> V583 Δ ABC	<i>E. faecalis</i> V583 curado dos seus plasmídeos, RepA ⁻ , Ery ^s	LME Caen
<i>E. faecalis</i> VE14412	<i>E. faecalis</i> V583 Δ ABC + pG+host3	UBLO Jouy
<i>E. faecalis</i> V583 Δ ABC Δ EF2292	Mutante isogénico V583 Δ ABC com deleção no gene EF2292	Este estudo
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> VE14188	<i>E. coli</i> GM1674 (<i>dam</i> ⁻ <i>dcm</i> ⁻ <i>repA</i> ⁺), Amp ^s e Ery ^s	UBLO, Jouy-en-Josas
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ <i>ompT</i> <i>gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Novagen
<i>E. coli</i> C41	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Lucigen
<i>E. coli</i> C43	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Lucigen
<i>E. coli</i> Rosetta 2	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen
Plasmídeos		
pGEM®-T	Vector de Clonagem, Amp ^r , Ori1, <i>lacZ</i>	Promega
pG+host9	Vector de Clonagem, Ery ^r , Ori1, Ori2 e replicação termosensível	UBLO, Jouy-en-Josas
pG+host3	Vector de Clonagem, Ori2 e replicação termosensível	UBLO, Jouy-en-Josas
pVE14218	Vector de Clonagem, Ori ⁺ , RepA ⁻ , Tet ^r	UBLO, Jouy-en-Josas
pET-15b	Vector de Expressão, Amp ^r , Ori1, N-terminal His.tag	Novagen

Ori1 – Origem de replicação em *E. coli*Ori2 – Origem de replicação em *E. faecalis*

Ery – Eritromicina

Amp – Ampicilina

Tet – Tetraciclina

s – sensível

r - resistente

Tabela 6.2 – Sequência dos *primers* utilizados na sequenciação dos fragmentos III dos EF1231 e EF2292.

Região	Primer	Sequência (5'→3')
EF1231	12P1F	GTATTGTCTGTGTTTCGTGCG
	12P2R	ACCTAAGTTATGGCGCTTGC
	12P3F	TCTTTAGGTTGTTTAACAAAGCC
	12P4R	CCACATCACTCGCTCCTTTC
	12P5F	TGCATTGGATGGTACTTCCG
	12P6R	AAGAAACCGTGTCAACAATCG
EF2292	22P1F	CGACCGAATAAGGTAGTAGG
	22P2R	TCGCATCATCGGCACAAAGG

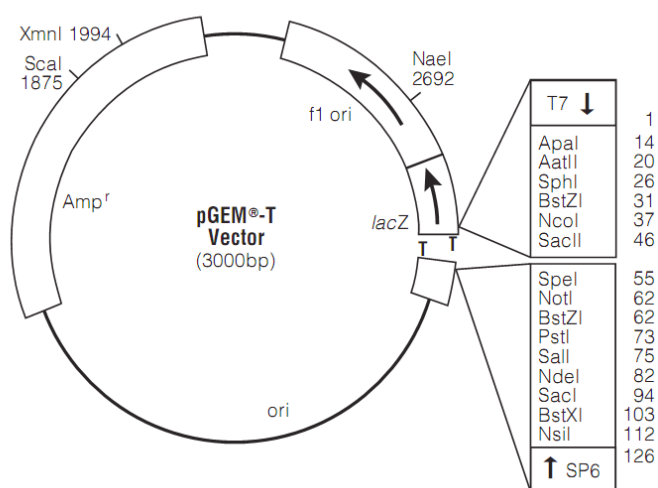


Figura 6.1 – Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM®-T (Promega).

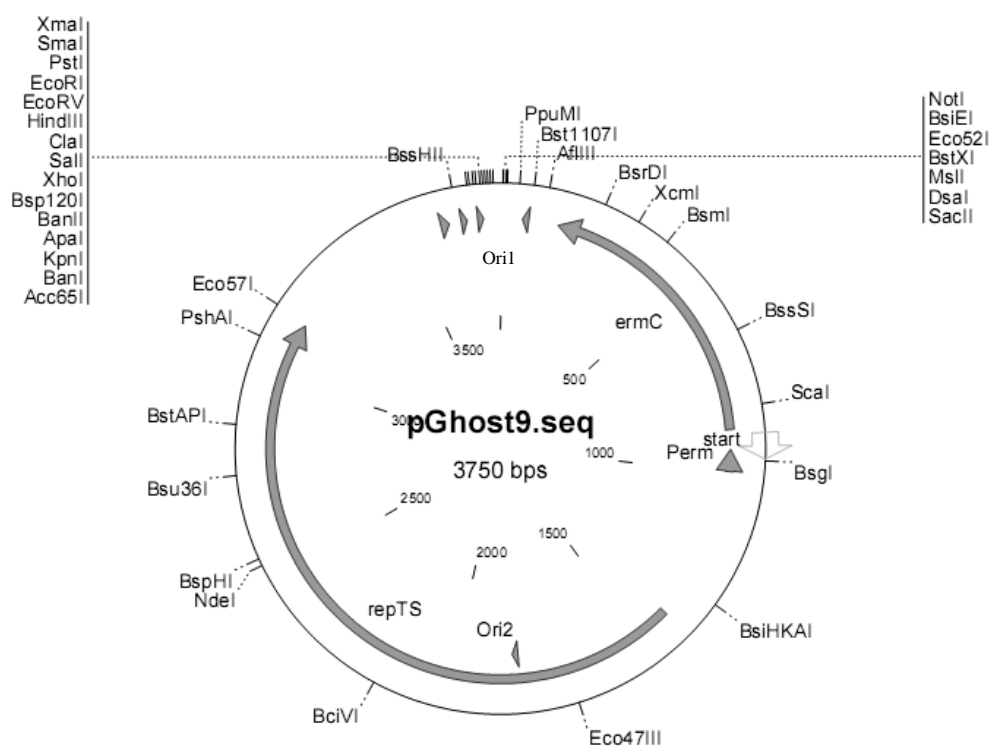


Figura 6.2 - Representação esquemática do plasmídeo pG+host9 (UBLO, Jouy-en-Josas).

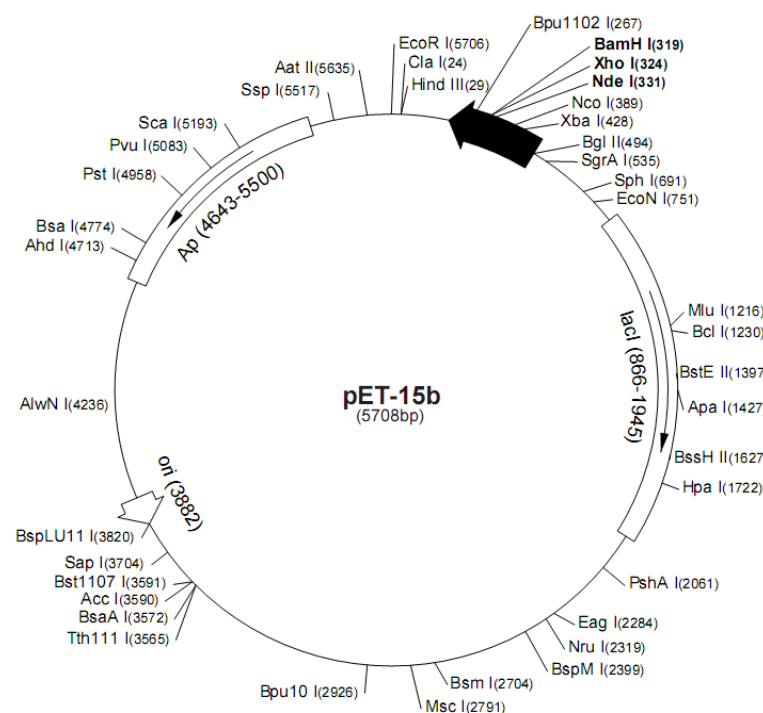


Figura 6.3 – Representação esquemática do plasmídeo pET-15b (Novagen). A sequência N-terminal que codifica para a cauda de 6 histidinas está localizada entre 362 e 380 pb.

